

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

TESI DI LAUREA IN SCIENZE AMBIENTALI

PROCESSO DI DISIDRATAZIONE E STABILIZZAZIONE DI FANGHI BIOLOGICI IN
LETTI VEGETATI (*PHRAGMITES AUSTRALIS*)

Relatori:

Prof. Alessandro Saviozzi

Dott. Grazia Masciandaro

Candidato: Angela Viglianti

ANNO ACCADEMICO 2004-2005

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUZIONE | 6 |
| Problematiche fanghi | 7 |
| La fitostabilizzazione | 9 |
| Caratteristiche del processo | 9 |
| Struttura e gestione degli impianti | 11 |
| Descrizione della <i>Phragmites australis</i> . | 12 |
| Il ruolo della <i>Phragmites Australis</i> | 12 |
| Indicatori qualità dei fanghi | 16 |
| Indicatori non convenzionali: le attività biochimiche. | 18 |
| Complesso uomo-enzimatico | 20 |
| Confronto con i sistemi tradizionali | 20 |
| Inquadramento del lavoro di tesi | 22 |
| OBIETTIVI | 23 |
| Schema di lavoro | 25 |
| Studio di fattibilità | 25 |
| Avvio della sperimentazione | 25 |
| MATERIALI E METODI | 27 |
| Misure spettrofotometriche | 28 |
| Misure potenziometriche | 28 |
| Misure conduttometriche | 29 |
| Misure cromatografiche | 29 |
| Materiali | 30 |
| Metodologie chimiche | 30 |
| Parametri chimici | 33 |
| Umidità | 33 |
| pH | 33 |
| Conducibilità elettrica | 33 |
| Azoto ammoniacale | 33 |
| Azoto totale | 33 |
| Carbonio organico totale | 34 |
| Carbonio idrosolubile | 34 |
| Carbonio estraibile totale | 35 |
| Carbonio fulvico (C-AF) | 35 |
| Carbonio umico (C-AU) | 36 |
| Carbonio estraibile extracellulare | 36 |
| Fosforo totale | 36 |
| Metalli pesanti | 37 |
| Anioni | 37 |

| | |
|---|--------|
| Parametri biochimici | 39 |
| Deidrogenasi | 39 |
| β -Glucosidasi | 40 |
| Fosfatasi | 41 |
| Ureasi | 42 |
| Proteasi-BAA | 42 |
| Parametri biologici | 44 |
| Test di fito-tossicità | 44 |
| Analisi Statistica | 45 |
| Principi dell'analisi statistica multivariata delle componenti principali | 45 |
| RISULTATI E DISCUSSIONE | 47 |
| Parametri del processo. | 48 |
| pH | 48 |
| Conducibilità elettrica (C.E.) | 49 |
| Azoto organico totale | 50 |
| Azoto ammoniacale | 52 |
| Fosforo totale | 53 |
| Anioni e cationi | 55 |
| Carbonio organico totale | 58 |
| Carbonio idrosolubile | 60 |
| Attività enzimatiche | 61 |
| Deidrogenasi | 61 |
| β -glucosidasi totale | 63 |
| Fosfatasi totale | 65 |
| Ureasi totale | 67 |
| Proteasi-BAA totale | 69 |
| Parametri dell'umificazione | 70 |
| Carbonio estraibile totale (sostanza umica) Carbonio fulvico (AF) Carbonio umico (AU) | 70 |
| Carbonio estraibile extracellulare | 73 |
| Attività enzimatiche extracellulari | 74 |
| β -Glucosidasi e fosfatasi extracellulari | 74 |
| Proteasi e ureasi extracellulari | 76 |
| Test di fito-tossicità | 78 |
| Riduzione dei fanghi | 79 |
| Vantaggi economici del processo. | 81 |
| Analisi statistica | 82 |
| Correlazione tra le attività enzimatiche | 85 |
| CONCLUSIONI | 94 |
| BIBLIOGRAFIA | 97 |

Un sincero ringraziamento alla Dott.ssa Grazia Masciandaro, al Dott. Brunello Ceccanti ed al Prof. Alessandro Saviozzi per avermi indirizzato nella scelta dell'argomento di tesi, per avermi guidato nello svolgimento delle fasi sperimentali del lavoro e per l'aiuto datomi nella stesura.

Ringrazio il Dott. Guido Vigna Guidi, Responsabile della Sezione di Chimica del Suolo, Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del C.N.R. Pisa, per avermi ospitato presso i laboratori di tale centro.

Un ringraziamento a Serena Doni, Eleonora Peruzzi, Cristina Macci per l'aiuto datomi durante lo svolgimento del lavoro di tesi e per il sostegno morale.

Abstract

Il presente lavoro di tesi propone una ricerca sulla disidratazione e stabilizzazione dei fanghi biologici, in letti vegetati (*Phragmites australis*), come valida alternativa alle tecniche tradizionali. Le piante, oltre a partecipare alla disidratazione dei fanghi, stabiliscono le condizioni favorevoli alla mineralizzazione della frazione organica ad opera dei batteri adesi alla struttura radicale (*rizosfera*).

Il lavoro ha previsto la piantumazione di *Phragmites* nei 4 letti (100 m^3) adiacenti l'impianto, l'immissione ogni 15 giorni di 20 m^3 di fango (al 2% sostanza secca) e 4 campionamenti stagionali. Per monitorare la trasformazione dei fanghi sono stati valutati i parametri chimico-fisici e biologici, legati ai cicli di C, N, P ed alla biomassa microbica. La *Phragmites* ha incentivato lo sviluppo delle colonie microbiche, assimilato nutrienti e apportato ossigeno a livello radicale, migliorato la conduttività idraulica del letto, determinato la riduzione dei volumi dei fanghi e di conseguenza la loro mineralizzazione/stabilizzazione.

Gli odori molesti e la diffusione di insetti sono stati eliminati e dall'analisi dei costi è emerso un risparmio nella gestione dei fanghi del 30-40% rispetto ai trattamenti convenzionali

Introduzione

Problematiche fanghi

Una vera e propria politica ambientale da parte dei governi occidentali risale alla fine degli anni '60, quando la nuova consapevolezza sociale hanno portato ad attuare interventi coordinati per la difesa ambientale, in precedenza affidati a normative parziali ed isolate, soprattutto in materia igienico-sanitaria, di difesa del suolo e dell'acqua, del paesaggio e, in minor misura, della natura.

Dalla metà degli anni '70, la politica ambientale è stata dichiarata compito comunitario e le direttive comunitarie hanno avuto un'importanza crescente, limitando gli spazi di autonomia statale (in materia di tutela dell'aria e dell'acqua dall'inquinamento, smaltimento dei rifiuti, difesa della natura).

Il ritardo della politica ambientale italiana, nell'adozione degli strumenti normativi ed organizzativi, appare consistente rispetto agli altri Paesi industrializzati.

Per quanto concerne la salvaguardia delle risorse idriche, in Italia si è giunti alla definizione di una reale normativa solo nel 1976 con la Lg.Merli (Testo unico delle acque: norme per la tutela delle acque dall'inquinamento), al contrario di quanto avvenuto in Germania e Francia già da prima sensibili a tale problematica. La normativa italiana aveva necessità di assicurare condizioni limite di scarico degli effluenti e, come soluzione, portò all'adozione delle tecniche di depurazione dei reflui.

Naturalmente tutto questo meccanismo, non risolveva completamente le problematiche di tipo ambientale, in quanto la "depurazione" non elimina gli inquinanti e le sostanze comunque indesiderate, ma bensì le trasferisce ad un altro mezzo (fango), eventualmente concentrandole.

Questo è il motivo per cui si cominciò a prospettare la problematica della collocazione dei fanghi di depurazione.

Parlando di "fanghi" ci si riferisce a prodotti identificati da dispersioni di solidi in liquidi (tipicamente acqua). In particolare, per "fango di depurazione" deve intendersi la parte non chiarificata derivante dalla separazione solido-liquido realizzata nell'ambito della depurazione di un refluo, ai fini di ricondurlo entro i limiti definiti per lo scarico in un corpo idrico ricettore .

La problematica del trattamento e smaltimento dei fanghi ha assunto sempre più importanza sia a livello comunitario (direttiva 86/278/CEE del 12/06/1986) che a livello nazionale (D.Lgs 99 del 27/01/1992) e regionale (L.R. 94 del 13/12/1983 e D.G.R. 6943 del 22/03/1991). Nel nostro paese la progressiva attuazione della Direttiva 91/271/CEE (recepita con il D. Lgs. 152/99) concernente il trattamento delle acque reflue urbane, comporta un costante aumento dei quantitativi di fanghi, originati dai processi di depurazione. Tale norma individua i fanghi decadenti da un processo produttivo o da una fase di depurazione come rifiuti, in quanto soddisfacenti la condizione di "destinazione all'abbandono" da parte dell'iniziale produttore.

In particolare i fanghi sono poi classificati quali "rifiuti speciali" (pericolosi o non pericolosi), e sono previste numerose codifiche (CER, Catalogo Europeo dei Rifiuti) che li individuano, sia in termini generici che specifici, secondo la loro provenienza (non arrivando però a coprire tutta la possibile casistica).

La normativa inoltre classifica i fanghi come residui derivanti dai processi di depurazione:

- delle acque reflue provenienti esclusivamente da insediamenti civili (art. 2, comma 1, lettera g, ed art. 28, comma 7, D.Lgs n. 152 del 11/05/1999 - acque reflue domestiche ed assimilate);
- delle acque reflue provenienti da insediamenti civili e produttivi (devono possedere caratteristiche sostanzialmente non diverse da quelle possedute dai fanghi di cui sopra);
- delle acque reflue provenienti esclusivamente da insediamenti produttivi; tali fanghi devono essere assimilabili per qualità a quelli di cui al primo punto in quanto ad idoneità all'uso agricolo.

I fanghi non devono comunque essere (per contenuto di sostanze tossiche, nocive, persistenti o bioaccumulabili) dannosi per terreno, colture, animali, uomo o ambiente, inoltre dovrebbero avere un effetto ammendante.

In Europa da una produzione annuale di circa 5.5 milioni di tonnellate (sostanza secca) del 1992 si tende a raggiungere una produzione di circa 9 milioni di tonnellate prevista per il 2005 ("Sewage Sludge" Commissione Ambiente).

A seconda della loro natura i fanghi possono essere gestiti in vari modi:

- collocazione in discarica, eventualmente dopo inertizzazione, cioè miscelazione con leganti minerali (cementi, argille) e/o organici (resine, chelanti) che intrappolano, impedendone o limitandone il rilascio, gli elementi e le sostanze particolarmente inquinanti contenute nei fanghi; la soluzione vale sia per i fanghi a matrice organica che per quelli a matrice inorganica;
- termodistruzione: la soluzione può essere adottata solo per i fanghi a matrice organica, che possono così essere termodistrutti in particolari forni, eventualmente con recupero energetico (comunque scarso per questa tipologia di rifiuti, data la necessità di allontanare l'acqua che li imbibisce).
- recupero diretto in agricoltura: anche qui si sfruttano le caratteristiche agronomiche di alcuni fanghi organici, provvedendo anche a risolvere in parte il problema prettamente agricolo di impoverimento del contenuto di sostanza organica dei terreni;
- recupero: vale solo per i fanghi a matrice organica in particolare in alcune produzioni per l'edilizia, miscelati con argille, cementi ed altri materiali o fatti fermentare insieme ad altri rifiuti organici per la produzione di "compost" da destinarsi quale concime per l'agricoltura .

In Italia i fanghi sono considerati, in generale, un rifiuto e il loro prevalente destino è lo smaltimento in discarica. Il cambiamento di determinate condizioni, come l'aumento dei quantitativi prodotti in conseguenza del numero crescente di impianti di depurazione e le normative più restrittive sullo smaltimento in discarica, costringono peraltro a considerare con sempre maggiore attenzione le possibilità di riutilizzo dei fanghi e l'impiego di nuove tecniche (APAT, 2004).

La fitostabilizzazione

Caratteristiche del processo

Normalmente i fanghi vengono sottoposti a processi di stabilizzazione e riduzione dei volumi, trattamenti termici, igienizzazione, controllo degli odori, utilizzando tecniche convenzionali come l'ispessimento, la disidratazione meccanica e l'essiccamento termico, per le quali non vi sono stati sostanziali sviluppi tecnologici. Una valida alternativa per il trattamento dei fanghi può

essere rappresentata dalla fitostabilizzazione. Questo processo consiste nella disidratazione e nella digestione dei fanghi biologici in vasche o bacini aperti impermeabilizzati dotati di sistema di raccolta del percolato e muniti di un substrato granulare inerte nel quale vengono impiantati i rizomi delle macrofite radicate emergenti. I fanghi, provenienti direttamente dalla vasca biologica e quindi ancora molto liquidi, sono sparsi a strati, nella maniera più uniforme possibile, sulla superficie dei letti in modo da permettere la percolazione delle acque e l'ispessimento dei fanghi. Le acque di percolazione si riciclano all'impianto di depurazione. Le macrofite radicate, oltre a partecipare attivamente alla disidratazione dei fanghi, stabiliscono le condizioni favorevoli allo svolgimento di un complesso di processi che hanno come risultato la progressiva mineralizzazione della frazione organica ad opera dei batteri adesi alla fitta struttura radicale (*rizosfera*) e l'igienizzazione della materia secca.

La disidratazione dei fanghi utilizzando piante acquatiche è stata sperimentata inizialmente in Germania alla fine degli anni '60. Esistono attualmente un centinaio di impianti in tutto il mondo di cui una cinquantina in Europa. In tutti gli impianti è stata utilizzata la cannuccia di palude (*Phragmites*). L'interesse per tali impianti si è risvegliato grazie ai risultati pubblicati da Nielsen in Danimarca (1990,1993,1994), Liénard ed Esser in Francia (1990,1995), De Maesseener in Belgio (1993) e da Kim negli Stati Uniti (1994-1997) che hanno fornito risposte positive in termini di inserimento paesaggistico-ambientale, di efficienza depurativa, di capacità di sopportare variazioni quali-quantitative dei reflui, di economicità di realizzazione e di manutenzione. E' interessante, dal punto di vista gestionale, lo studio americano che mostra i vantaggi dei letti di fitostabilizzazione rispetto ad altre tecniche finora usate quali la disidratazione meccanica, i letti con base di sabbia, i wedge-waterbeds e lo spandimento diretto in agricoltura (Kim et al., 1997).

Sulla base dei dati raccolti, quindi, abbiamo cercato di adattare le esperienze europee e d'oltreoceano alla realtà di piccoli comuni italiani.

Per la prima volta nel nostro Paese è stato realizzato un impianto per il trattamento e la disidratazione dei fanghi a "impatto zero", dove tutti i processi che

avvengono sono governati dall'energia solare, dalla forza gravitazionale e dalla capacità vegetativa e mineralizzatrice delle piante.

Struttura e gestione degli impianti

Le caratteristiche strutturali di questo tipo di impianti sono simili a quelli dei tradizionali letti di essiccamento di emergenza che spesso sono inutilizzati presso gli impianti di depurazione. Le vasche di fitoessiccamento, pertanto, possono essere realizzate modificando opportunamente tali impianti. Il fondo dei letti di fitoessiccamento è costituito da materiale drenante, generalmente ghiaia a diverse dimensioni, in cui è posizionata una tubazione forata per la raccolta del percolato. Immediatamente sopra è posto uno strato intermedio di ghiaietto per prevenire l'intrusione della sabbia posta nello strato superiore. I rizomi delle piantine vengono impiantati nello strato intermedio tra la sabbia e il ghiaietto. L'applicazione del fango all'impianto deve avvenire per strati non troppo spessi al fine di non creare accumulo eccessivo di liquido sul fondo drenante, e quindi condizioni di anaerobiosi spinta. La quantità di fango che si può trattare annualmente è funzione della concentrazione in solidi sedimentabili e del tipo di fango. Un fango aerobico infatti determina uno stress vegetativo inferiore rispetto ad un fango anaerobico. I cicli di carico devono tenere conto delle condizioni climatiche, per cui nei mesi caldi sarà possibile effettuare un carico di uno strato di 10-20 cm ogni 10 giorni, mentre nei periodi invernali tale intervallo si allunga a 15-20 giorni. Circa il 75-80% dei solidi sospesi volatili viene distrutto durante la lunga permanenza del fango nei letti vegetati. Il risultato di questa perdita unita a quella dell'acqua contenuta, fa sì che dello spessore di 5-6 metri di fango che vengono applicati annualmente, ne rimangono meno di 10-20 centimetri. Questo permette un accumulo di fango nei letti drenanti per tempi lunghi, anche oltre 10 anni senza nessuna manutenzione, salvo l'assicurare il mantenimento delle capacità filtranti del letto

Descrizione della *Phragmites australis*.

Phragmites Australis (Cav.) Trin. ex Steudel

Canna di valle, Cannuccia di palude, Cannella, Canea (Ven.) faro.

GRAMINEAE

Descrizione

Pianta dotata di un robusto culmo eretto, cilindrico, con pareti sottili ma molto resistenti, alto anche 3-4m, e di un lungo rizoma sotterraneo (geofita). Le foglie spuntano ciascuna da un nodo e sono lineari lanceolate.

I fiori sono riuniti in infiorescenze a pannocchia e la fioritura avviene da agosto ad ottobre.

Ambiente

Questa pianta forma fitti popolamenti nelle acque poco profonde delle paludi, presso le rive dei laghi, le sponde dei fiumi, i corsi d'acqua lenti su suoli umidi. La cannuccia si trova nelle valli salmastre, negli acquitrini intradunali, al centro delle barene dove minore è l'erosione delle acque marine, sugli argini o sulle bassure delle aree bonificare. La sommersione delle radici può essere intermittente o costante. Coi suoi rizomi e coi detriti di tutte le sue parti contribuisce più di ogni altro vegetale all'interramento di laghi e al prosciugamento naturale delle paludi.

Annotazioni

E' utilizzata per usi diversi: come lettiera, per fabbricare stuoie e graticci, per impagliare sedie, fabbricare scope, ecc.

Il ruolo della *Phragmites Australis*

L'attenzione sempre maggiore nei confronti dell'impiego di tecnologie eco-compatibili per il trattamento dei fanghi provenienti da piccoli insediamenti abitativi o da depuratori tradizionali, ha determinato un notevole incremento nella progettazione e realizzazione di sistemi di depurazione naturali. In Italia, la recente normativa in materia di tutela delle risorse idriche (D.Lgs. 11 maggio 1999, n.152) ha ribadito l'importanza dell'impiego di tali tecniche in alternativa ai

sistemi tradizionali, in particolare di sistemi basati sull'uso di macrofite galleggianti, radicate sommerse ed emergenti. La pianta più diffusa in questo tipo di sistemi di depurazione naturale è la *Phragmites australis* (Cav.) Trin.ex Steud ((Kim, 1997). La sua peculiarità è la resistenza in ambienti ostili, come i fanghi, dove le radici sono permanentemente esposte a condizioni anaerobiche. Il processo di stabilizzazione dei fanghi biologici legato all'attività delle macrofite avviene a livello del sistema radicale che, affondato nel substrato, promuove una serie di processi atti alla depurazione incrementando la degradazione aerobica (Hardey, Ozimek, 2001). L'impianto radicale è formato da una prima serie di radici dette principali, da cui parte un impianto secondario seguito da un terziario, tale da formare un apparato che si espande in tutte le direzioni e assicura alla pianta un'esplorazione capillare del substrato per soddisfare le sue esigenze nutritive e ancorarsi. Le radici sono ricoperte in sommità da una cuffia radicale che le protegge e trattiene l'acqua all'interno. Essa è intervallata a zone permeabili da dove cominciano a estendersi i peli radicali anch'essi permeabili. Lo scambio di sostanze con il suolo avviene in questa zona. Il substrato attorno all'impianto radicale viene detto rizosfera e diviene nel tempo un habitat naturale per lo sviluppo di popolazioni microbiche tra cui i batteri (Cooper et al., 1996) che rilasciano zuccheri e acidi organici (composti del carbonio), fondamentali per la presenza della vita. Le radici assorbono dalle soluzioni, tramite i peli radicali, soluti inorganici tra cui il fosforo che spesso si trova in forma non assimilabile. Le piante promuovono una serie di reazioni per facilitarne l'estrazione:

- Formazione di micorrize
- Variazione dello sviluppo delle radici
- Acidificazione della rizosfera
- Essudazione di acidi organici

Inoltre nitrati e i nitriti, per essere sfruttati dalla pianta, vengono ridotti in ammonio che reagisce dando luogo alla formazione di composti organici.

L'uso della *Phragmites* è più diffuso anche a causa della minore manutenzione che essa richiede. È una macrofita radicata emergente, e come tale, ha un'alta capacità di trasferimento dell'ossigeno dalla parti aeree alla parti sommerse (Armstrong et al., 1990). La quantità di apporto di ossigeno varia dai 5 ai 45

g/giorno/m² a seconda della densità delle piante, della richiesta di ossigeno da parte del substrato saturo e dalle caratteristiche delle radici. Queste penetrano fino a 0.7 m ed essendo sommerse risentono poco dei cambiamenti climatici, inoltre hanno la particolarità di non essere gradite né alle nutrie né ai ratti.

Il ruolo svolto dalle piante acquatiche sui fanghi di supero è il risultato di più fattori che intervengono contemporaneamente (De Maeseneer et al., 1988):

- a) *Aspirazione dell'acqua*: la fitta rete di rizomi sviluppatasi all'interno del fango aspira l'acqua raggiungendo una capacità di suzione pari e a volte superiore a 16 atm. I letti di fitoessiccazione possono raggiungere e superare le 20 atmosfere di pressione osmotica raddoppiando la capacità di evaporazione di un letto di essiccamento privo di piante.
- b) *Disidratazione dei fanghi e stabilizzazione*: L'ispessimento dei fanghi dipende essenzialmente da tre processi: l'evapotraspirazione, la percolazione e la mineralizzazione. Il primo fattore avviene soltanto nella stagione di sviluppo vegetativo; la seconda è soprattutto localizzata nella primissima fase di immissione del fango. La stabilizzazione è dovuta a tutta quella serie di processi che avvengono grazie alla degradazione della sostanza organica da parte dei microrganismi.
- c) *Effetto meccanico*: rizomi e le radici delle canne penetrano nel fango, e ricacciano sulla superficie evitando la formazione di crosta, che impedirebbe la disidratazione uniforme dello strato di fango.

La biomassa vegetale fornisce lignina e composti fenolici aromatici che favoriscono la stabilizzazione biologica. Queste sostanze, infatti, giocano un ruolo molto importante nella costruzione di acidi umici in quanto costituiscono lo scheletro delle molecole umiche. Le secrezioni delle radici delle piante provocano la flocculazione dei colloidali organici con conseguente polimerizzazione, ciò migliora in maniera sensibile la disidratabilità del fango stesso.

La manutenzione delle piante, presenti nei letti di fitostabilizzazione, consiste nel taglio annuale, preferibilmente in inverno, al disopra del livello che sarà raggiunto dal fango nei successivi carichi che precedono la ripresa dello sviluppo vegetativo. E' preferibile rimuovere gli sfalci in modo da massimizzare

l'accumulo di fango all'interno della vasca. Il vegetale potrebbe essere lasciato a dimora nel letto per attivare una fase di pre-compostaggio .

Indicatori qualità dei fanghi

Si fornirà qui un sunto dei parametri qualitativi dei fanghi, da individuarsi in limiti massimi di concentrazione di alcuni elementi e sostanze, che la normativa vigente nel nostro territorio impone per il loro utilizzo in agricoltura (D.Lgs 99/1992, Appendice 1).

Per impianti di potenzialità inferiore a 5000 ab. eq. le analisi dei fanghi devono vertere sui seguenti parametri (sono indicati anche i limiti stabiliti laddove esistenti):

| | |
|--|--------------------------------|
| Caratteristiche chimiche | |
| pH | |
| sostanza secca (residuo secco a 105°C) | |
| residuo secco a 600°C | |
| carbonio organico | $\geq 20 \%_{ss}$ |
| grado di umificazione | |
| azoto totale | $\geq 1.5 \%_{ss}$ |
| fosforo totale | $\geq 0.4 \%_{ss}$ |
| potassio totale | |
| Cadmio | $\leq 20 \text{ mg/kg}_{ss}$ |
| Cromo III | $\leq 750 \text{ mg/kg}_{ss}$ |
| Mercurio | $\leq 10 \text{ mg/kg}_{ss}$ |
| Nichel | $\leq 300 \text{ mg/kg}_{ss}$ |
| Piombo | $\leq 750 \text{ mg/kg}_{ss}$ |
| Rame | $\leq 1000 \text{ mg/kg}_{ss}$ |
| Zinco | $\leq 2500 \text{ mg/kg}_{ss}$ |
| conducibilità estratto acquoso | |

Tabella 1 - Caratteristiche chimiche dei fanghi

| Caratteristiche agronomiche | |
|-----------------------------|------------------------|
| carbonio organico | $\geq 20\text{ \%ss}$ |
| grado di umificazione | |
| azoto totale | $\geq 1.5\text{ \%ss}$ |
| fosforo totale | $\geq 0.4\text{ \%ss}$ |
| potassio totale | |

Tabella 2 - Caratteristiche agronomiche dei fanghi

| Caratteristiche microbiologiche | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| coliformi fecali | $\leq 10000\text{ MPN/g}_{\text{ss}}$ |
| uova di elminti | assenti |
| salmonelle | $\leq 100\text{ MPN/g}_{\text{ss}}$ |

Tabella 3 - Caratteristiche microbiologiche dei fanghi

A causa dei trattamenti fisici-chimici a cui vengono sottoposti, i fanghi tendono ad accumulare metalli pesanti mal biodegradabili, residui organici in traccia come pure organismi potenzialmente patogeni (virus, batteri ecc.). Tuttavia i fanghi biologici sono ricchi di fosforo, azoto e contengono la materia organica necessaria al ripristino di terreni degradati e sottoposti ad erosione. La materia organica e le sostanze nutrienti sono gli elementi principali per i quali questo genere di substrato viene sparso sul suolo come fertilizzante. L'obiettivo dell'U.E è la gestione integrata dei fanghi, con controlli adatti al rischio e parametri da rispettare obbligatori, al fine di proteggere l'ambiente. Se la qualità già alta del fango deve essere migliorata, è necessario che le Direttive si occupino delle fonti diffuse domestiche (abitazioni ecc.): il problema deve essere affrontato a livello europeo e non nella legislazione nazionale, altrimenti il mercato libero potrebbe risentirne .

La prevenzione, tramite il controllo delle fonti con parametri opportuni, è importante da effettuare per migliorare ancora di più la qualità dei fanghi dei reflui civili (Ockiers, "Problems around sludge", 1999).

Indicatori non convenzionali: le attività biochimiche.

Come si vedrà in seguito, le analisi fatte durante la sperimentazione si focalizzano soprattutto sull'andamento delle attività enzimatiche oltre ovviamente agli altri parametri chimico-fisici. Si è scelto di procedere in questo modo dai dati presenti in letteratura dove si evince che, per questo tipo di materiale (fanghi), le analisi microbiche usate di solito non sono attendibili (Sastre et al., 1996) e che la misura delle attività enzimatiche, in quanto parte integrante del ciclo dei nutrienti, è indice dell'attività biologica (Ladd & Buttler, 1975). Inoltre molti studi concordano sul dire che la materia organica presente nei fanghi ha effetti stimolanti su tutte le attività enzimatiche (Ceccanti et al., 1978; Nannipieri et al., 1988). La composizione chimica e biologica dei fanghi di depurazione è varia: il range delle concentrazioni può andare dallo 0,1% al 17,6% per l'azoto, dallo 0,1% al 14,3% per il fosforo, dallo 0,002% al 2,6% per il potassio (Sabey, 1980). Comunque solo una piccola porzione di questi nutrienti è in forma inorganica, quindi assimilabile dalle piante; da qui l'importanza delle popolazioni microbiche e dei loro enzimi responsabili della decomposizione e mineralizzazione della frazione organica che usano parte dei composti presenti nei residui come fonte di nutrienti ed energia per la formazione della loro biomassa (Brookes, 1995; Pantes, 2002)

Nei fanghi, così come nel terreno, non si trovano solo enzimi di origine microbica (Ladd, 1978), ma anche di origine animale e vegetale (Tabatabai, 1994). La loro localizzazione dipende dal microambiente in cui agiscono.

Si possono quindi distinguere due classi di enzimi: intracellulari e extracellulari (Burns, 1982).

Gli enzimi intracellulari sono associati con le cellule metabolicamente attive con una localizzazione citoplasmatica o periplasmatica oppure sono legati alla membrana o parete cellulare. Gli enzimi extracellulari sono sintetizzati e rilasciati dai microrganismi all'esterno della cellula e possono essere:

- ✓ presenti nella fase acquosa del substrato, prodotti durante il normale ciclo vitale di una cellula o liberati nel mezzo circostante dopo la morte e la conseguente lisi cellulare;
- ✓ presenti nelle cellule morte e nei residui cellulari;
- ✓ immobilizzati sulle argille e sui costituenti inorganici del substrato, oppure legati alle sostanze umiche a formare complessi umo-enzimatici.

Le attività enzimatiche che rivestono il maggiore interesse sono le idrolasi e le ossidoriduttasi.

Le idrolasi trasformano le macromolecole in composti più semplici, rompendo legami covalenti per aggiunta di una molecola d'acqua (reazione di idrolisi). La degradazione di macromolecole quali carboidrati, proteine e composti organici del fosforo e la conseguente mineralizzazione dei loro prodotti monomerici riveste una grande importanza nei cicli biologici dei nutrienti (C,N,P,S).

Le ossidoriduttasi (ad esempio l'attività deidrogenasica) catalizzano, in presenza di cofattori (NAD^+ e NADP^+), l'ossidazione di numerosi composti organici. Da quanto detto, è chiaro che l'attività di un singolo enzima non può essere utilizzata per determinare lo stato metabolico globale di un fango, o lo stato totale dei nutrienti, anche perché ogni singola attività enzimatica riflette la specificità di substrato e può fornire informazioni solo sul relativo processo metabolico. Al contrario la misurazione contemporanea dell'attività di vari enzimi risulta efficace come parametro marcatore della bioattività generale del suolo, con particolare interesse verso quelle attività che agiscono sui processi fondamentali di biodegradazione della materia organica. E' inoltre importante tener presente in questo genere di studi che l'andamento delle attività microbiche dipende fondamentalmente dalla qualità e quantità delle aggiunte di fango: può esserci una stimolazione dell'attività, dovuta al carbonio ed ai nutrienti, oppure una inibizione, dovuta alla presenza di metalli pesanti ed altri inquinanti (Fernandes et al., 2004).

Complesso umo-enzimatico

Gli enzimi extracellulari, distribuiti nei fanghi come nei suoli, possono legarsi alle sostanze umiche formando dei complessi stabili biochimicamente attivi che prendono il nome di complesso umo-enzimatico. Gli enzimi così complessati sono protetti dalle sostanze umiche e mostrano perciò una maggiore resistenza agli stress chimico-fisici e all'attacco microbico presentando così un livello costante di attività enzimatica anche quando le condizioni sono proibitive per la vita microbica. Per questo motivo tali enzimi possono essere considerati indicatori della condizione metabolica di terreni particolarmente stressati (Masciandaro et al., 1999) e possono essere utilizzati per valutare la velocità di degradazione biologica di ecosistemi degradati.

Grazie alla loro stabilità, gli enzimi extracellulari complessati con le sostanze umiche provvedono, quindi, ad incorporare una componente storica nella valutazione dell'andamento dell'attività enzimatica. Tale complesso rappresenta un punto di transizione tra i processi chimici e quelli microbiologici (Ceccanti et al., 1998; Lal., 1994; Masciandaro et al., 1998).

Confronto con i sistemi tradizionali

Il confronto con i tradizionali sistemi di trattamento dei fanghi deve tenere conto dei seguenti punti:

economicità e semplicità di processo: i sistemi di fitoessiccamento presentano costi di costruzione e gestione enormemente inferiori a quelli necessari a realizzare un'intera linea fanghi tradizionale. La maggior parte degli impianti di depurazione in Italia ha una capacità inferiore ai 5000 a.e. e la stabilizzazione dei fanghi comincia nella vasca di aerazione dove possono permanere fino a tre settimane. Il mantenere una concentrazione alta di fango nelle vasche comporta un maggior consumo energetico per l'aerazione e problemi di sedimentazione. Per questo è importante una regolare estrazione dei fanghi. Si vuole infatti sottolineare che l'impianto di fitoessiccamento sostituisce l'intera linea di processo costituita

in genere da diverse unità operative quali l'ispessitore, il digestore e i dispositivi di disidratazione;

applicabilità anche a scala ridotta: a causa degli alti costi, i sistemi di trattamento tradizionali in genere non si applicano ad impianti di modesta potenzialità. In tali casi si preferisce ricorrere ad un trattamento centralizzato *ex situ* che comporta, oltre naturalmente ad oneri aggiuntivi, anche la movimentazione di materiale settico con ovvi rischi ambientali. Il costo dello smaltimento e trattamento fanghi costituisce normalmente il 20-25% dell'intero costo del trattamento di depurazione; occorre poi aggiungere le spese di trasporto e smaltimento che variano a seconda del trattamento scelto, sia esso discarica, compostaggio o riutilizzo agronomico. E' evidente quindi il vantaggio della disidratazione e stabilizzazione tramite i letti, in quanto la riduzione dei volumi di acqua comporta una riduzione proporzionale dei costi.

produzione di materiale idoneo alla produzione di compost. La miscela costituita da fango mineralizzato e residuo vegetale di sfalcio viene rimossa dai letti solo quando essi sono saturi; la miscela fango-vegetale costituisce un'ottima matrice per il compostaggio che viene predisposto su una platea impermeabile o in vasca, all'impianto stesso se vi è spazio sufficiente.

Inquadramento del lavoro di tesi

La sperimentazione qui trattata, nata da un progetto di collaborazione tra l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi-Sezione di Chimica del Suolo (CNR Pisa) ed Acque S.p.a., mira alla stabilizzazione e disidratazione di fanghi biologici attraverso l'uso di piante acquatiche. Il fine è di ottenere un prodotto stabilizzato, con un trattamento eco-compatibile, ad impatto ambientale nullo ed economicamente vantaggioso.

La fitostabilizzazione è stata realizzata nei letti di essiccamento dei fanghi già presenti all'impianto di depurazione di La Rotta, Pontedera (Pisa). Tale impianto serve una popolazione di 2500 a.e. ed il fango biologico prodotto è di circa 400 mc/anno (al 2% di solido). I liquami in arrivo sono costituiti da reflui civili prevalentemente di tipo organico ed il primo trattamento che subiscono è la grigliatura fine, da qui confluiscono alla vasca di dissabbiatura-disoleatura. L'impianto è dotato di 2 linee di ossidazione e 2 di sedimentazione finale entrambe a pianta quadrata. Il liquame depurato arriva nella vasca di clorazione, alla cui estremità è ricavato il pozzetto di prelievo.

La linea dei fanghi consiste nel ricircolo dalle vasche di sedimentazione a quelle di ossidazione, mentre i fanghi di supero vengono pompati in 2 vasche di stabilizzazione. Da qui, normalmente, il fango stabilizzato viene aspirato con autobotte e smaltito; con l'avvio della sperimentazione viene pompato direttamente nei letti di fitostabilizzazione adiacenti l'impianto.

Obiettivi

Il presente lavoro di tesi è stato impostato con l'intento di perseguire i seguenti obiettivi:

- Verificare la fattibilità del processo di fitomineralizzazione dei fanghi biologici.
- Valutare l'efficacia del processo di stabilizzazione mediante parametri chimico-fisici e biologici.
- Stabilire l'azione delle piante nel processo di maturazione dei fanghi che si esplica mediante l'evapotraspirazione e l'attività della rizosfera.
- Considerare gli aspetti ecologici ed economici del processo.

Schema di lavoro

In questa sperimentazione è stato seguito un processo di fitostabilizzazione usando fanghi derivanti dall'impianto di depurazione per reflui civili del comune di La Rotta (Pontedera). Le analisi sono state svolte presso i laboratori dell'ISE-CNR di Pisa.

Studio di fattibilità

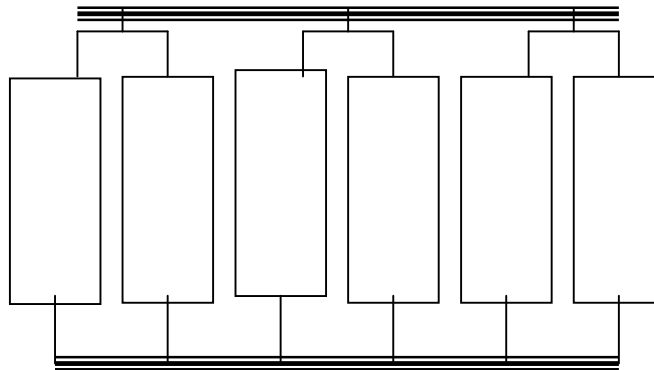
Nel Maggio 2004 sono state piantumate le *Phragmites australis* all'interno dei letti di essiccamento adiacenti l'impianto; questi sono 6 con le seguenti dimensioni: m 10 x 2,5 x 0,7; il volume di ogni singolo letto è di 17.5mc, mentre il volume totale dei letti corrisponde a (17.5mc x 6) 105mc.

Le prime 2 vasche sono state lasciate vuote per eventuali situazioni di emergenza dell'impianto, le altre 4 sono state così allestite: nella 3° e 4° vasca sono state piantumate circa 140 piante ad una distanza di circa 0,5 m l'una dall'altra, nella 5° e nella 6°, circa la metà.

I letti hanno alla base un substrato di ghiaia e sabbia (10-20 cm) per il posizionamento dei rizomi delle piante e per favorire il drenaggio. Per garantire lo sviluppo e l'accrescimento delle piante inizialmente è stata fornita acqua potabile e successivamente acqua di depurazione ricca in elementi nutritivi. Dopo circa 6 mesi le piante hanno raggiunto uno sviluppo vegetativo tale da consentire lo sversamento dei fanghi di depurazione e svolgere la loro azione di degradazione/maturazione ed evapotraspirazione.

Avvio della sperimentazione

Il primo sversamento di fango nei letti è stato effettuato nel mese di Novembre (2004). L'applicazione è avvenuta per strati non troppo spessi al fine di non creare accumulo eccessivo di liquido sul fondo drenante, quindi condizioni di anaerobiosi spinta.



L'apporto del fango consisteva in circa 5 m³ ogni 15 giorni per letto, cioè circa 40 m³ di fango/mese per 4 letti.

Il prelievo dei campioni di fango, al fine di valutarne una effettiva maturazione e caratterizzazione dal punto di vista qualitativo, è stato effettuato stagionalmente: Dicembre, Maggio, Agosto, Ottobre. A tale scopo, si interrompeva l'aggiunta di fango nelle quattro vasche per circa tre settimane e si prelevavano i campioni necessari per le analisi chimiche e biochimiche. In ogni vasca il campionamento consisteva nel prelevare un' aliquota di fango a circa 20 cm di profondità, quindi appena sopra lo strato di ghiaia, in sei punti diversi, nell'omeogenizzarle, ed infine trasferirle in un contenitore di plastica per trasportarli in laboratorio.

Mensilmente si procedeva alla misurazione di pH, conducibilità elettrica ed umidità. Inoltre, settimanalmente, veniva monitorata sia l'altezza del fango nei letti, per determinare la riduzione del volume immesso, sia la crescita e lo stato delle piante, per verificarne la risposta a questo particolare ambiente.

A circa un anno e mezzo dalla piantumazione è stato effettuato il taglio delle piante; il materiale vegetale derivante dallo sfalcio ed il fango stabilizzato, insieme al cippato od altro materiale di risulta, sono stati posti nei due letti non utilizzati per il fitoessiccamento dei fanghi per favorire la fase finale di maturazione mediante il classico processo di compostaggio

Materiali e metodi

Nel corso di questo lavoro di tesi sono state eseguite misure potenziometriche, conduttometriche, spettrofotometriche, cromatografiche e spettroscopiche con l'impiego delle seguenti strumentazioni:

Misure spettrofotometriche

Per le misure spettrofotometriche UV-Vis è stato impiegato uno spettrofotometro monoraggio mod. lambda 11 (Perkin Elmer, Germania) equipaggiato con una lampada a deuterio del voltaggio di 230V. Tutte le letture sono state eseguite nel campo del visibile impiegando celle in PMMA e celle di quarzo.

Misure potenziometriche

- Elettrodo a vetro: le misure di pH sono state eseguite tramite un Titroprocessor 672 della Methron (Switzerland), con scala di 0,01 unità, dotato di un elettrodo a vetro combinato Methron AG CH-9100 Herisau. Prima delle misure l'apparecchio è stato tarato con due soluzioni tampone rispettivamente a pH 4 e 7.
- Elettrodo ion-selettivo per l'ammoniaca: le letture della concentrazione dello ione ammonio sono state effettuate mediante l'elettrodo selettivo per NH_3 , Orion mod.9512, collegato ad un potenziometro (microprocessor ionalyzer-901 ORION RES., Cambridge, Mass., USA). L'elettrodo selettivo permette di misurare, in maniera semplice ed accurata, la concentrazione dello ione ammonio disciolto in una soluzione acquosa. Si tratta di un elettrodo combinato, costituito da un elettrodo di riferimento e uno di misura. L'elettrodo è caratterizzato dalla presenza, sulla sua estremità inferiore, di una membrana idrofobica, permeabile all' NH_3 gassosa. L'aggiunta alla soluzione campione di pochi ml di NaOH 10 M (quanto basta per portare il pH a valori alcalini), consente la liberazione di NH_3 allo stato di gas che, diffondendo attraverso la membrana, nella soluzione di NH_4Cl presente all'interno dell'elettrodo, determina una variazione di forza elettromotrice registrata dal potenziometro. La concentrazione dell'azoto ammoniacale è stimata comparando la forza elettromotrice della soluzione in esame con quella di soluzioni standard a concentrazione nota nel range 1-10 $\mu\text{g/ml}$.

Misure conduttometriche

Per le analisi conduttometriche è stato utilizzato un conducimetro tascabile modello Conmet 2 (Hanna Instruments Italia).

Misure di spettroscopiche

Lo spettrofotometro ad assorbimento atomico utilizzato è il Perkin-Elmer Modello 3030 dotato di:

- Sistema di correzione del fondo mediante effetto Zeeman.
- Fornace di atomizzazione con riscaldamento tipo THGA.
- Possibilità di determinazione fino a 6 elementi contemporaneamente.
- Sistema di alimentazione per lampade codificate HCL.
- Torretta portalampe a 4 posizioni.
- Software di gestione

Questa tecnica consente di determinare, per confronto con una curva di taratura, la concentrazione dei metalli presenti in una soluzione. Lo strumento effettua il prelievo di un volume noto di liquido e lo dispensa nella cella di misura costituita da un tubo di grafite dove un successivo ciclo termico consente di far evaporare gli elementi presenti. L'analisi dell'energia assorbita nelle opportune lunghezze d'onda consente di determinarne la concentrazione.

Misure cromatografiche

Cromatografo ionico: le misure per cromatografia anionica sono state effettuate con un cromatografo ionico, serie 2000i Dionex (DIONEX, Sunnyvale CA, USA), equipaggiato con un rivelatore a conducibilità. La separazione degli anioni è stata effettuata mediante una colonna AS4A-SC (4×250 mm) dotata di precolonna (4×50mm). Per la soppressione della conducibilità del fondo è stato impiegato un soppressore a membrana mod. AMMS-II (DIONEX). Come eluente è stata impiegata una miscela di Na_2CO_3 (1,8 mM) / NaHCO_3 (1,7 mM), mentre come soluzione rigenerante, una soluzione di H_2SO_4 25 mN. L'eluizione è stata condotta al flusso di 1ml/min.

Materiali

Per la preparazione degli esperimenti di laboratorio sono stati usati i seguenti materiali:

- fango presente nei letti di fitostabilizzazione da almeno 3 settimane
- piante della specie *Phragmites Australis*

I campioni di fango, prelevati stagionalmente in contenitori di plastica da un litro, sono stati portati in laboratorio, stesi e messi a seccare all'aria. A causa dell'alto contenuto d'acqua (90% circa), il processo di essiccamento dei fanghi durava circa 20-30 giorni e una volta terminato, si procedeva a frantumarli e setacciarli a 0,2 mm.

Metodologie chimiche

Durante questo lavoro di tesi sono stati valutati parametri chimici, biologici e biochimici

Le analisi chimiche effettuate una volta al mese :

- pH
- conducibilità elettrica.

Le analisi chimiche effettuate nei 4 campionamenti:

- umidità
- ammoniaca
- azoto totale
- fosforo totale
- carbonio totale
- carbonio idrosolubile
- carbonio extracell.tot.
- carbonio extracell.frazione 10^4
- sostanza umica totale
- acidi umici
- acidi fulvici

Le analisi biochimiche effettuate nei 4 campionamenti:

- deidrogenasi
- ureasi(tot.e extra)
- fosfatasi(tot.e extra)

- proteasi(tot.e extra)
- β -glucosidasi(tot.e extra)

Inoltre nell'ultimo campionamento sono stati aggiunti:

- anioni e cationi
- metalli pesanti (*Phragmites australis*)
- test di fito-tossicità

Le analisi sono state eseguite sul fango tal quale, sugli estratti acquosi, sugli estratti in pirofosfato alcalino e neutro.

Estratto acquoso:

In tubi di plastica da centrifuga sono stati posti materiale organico e acqua bidistillata in rapporto 1:10 peso/volume. I tubi sono stati messi ad agitare in bagno termostatico (tipo Doubnoff) a 37°C o a 60°C per 1 ora. Gli estratti sono stati quindi centrifugati a 9000 rpm per 15 minuti e il supernatante filtrato su membrana batteriologica della porosità di 0,45 μ m. Gli estratti a 37°C, sono stati utilizzati per eseguire le analisi di pH, conducibilità elettrica, anioni, ammoniaca, fitotest, mentre sull'estratto a 60°C è stato misurato il carbonio idrosolubile.

Estratti in pirofosfato alcalino:

In tubi di plastica da centrifuga sono stati posti il materiale organico e la soluzione di pirofosfato di sodio alcalino 0,1M (Na-PPi/H₃PO₄), pH 11, in rapporto 1:10 peso/volume. I tubi sono stati agitati in bagno termostatico a 60°C per 4 ore. Gli estratti sono stati quindi centrifugati a 9000 rpm per 15 minuti e il supernatante filtrato su membrana batteriologica 0,45 μ m.

Su tali estratti è stato determinato il carbonio estraibile totale, umico e fulvico.

Estratti in pirofosfato neutro:

In tubi di plastica da centrifuga sono stati posti il materiale organico e la soluzione di pirofosfato di sodio 0,1M a pH 7, in rapporto 1:10 peso/volume. Successivamente i tubi sono stati messi ad agitare in bagno termostatico a 37°C per 24 ore. Terminata l'incubazione, gli estratti sono stati centrifugati a 9000 rpm per 10 minuti ed il surnatante è stato filtrato su membrana batteriologica 0,45 μ m.

Gli estratti così ottenuti hanno subito un processo di dialisi prima di essere analizzati.

Il processo di dialisi ha previsto l'utilizzo di una cella da ultrafiltrazione (Amicon mod. 202), fornita di una membrana del taglio molecolare di 10000 Dalton. La cella da ultrafiltrazione era dotata di un sistema di agitazione costituito da una barretta magnetica collegata ad un'asta girevole e sospesa ad 1 mm circa sopra la membrana di esercizio in modo da non danneggiare la stessa. Con l'agitazione è stata impedita la formazione di un gradiente di concentrazione del materiale in esame sopra la membrana che poteva portare alla formazione di precipitati e all'occlusione dei micropori. Tutto il processo di ultrafiltrazione è stato eseguito in atmosfera di azoto.

Gli estratti dializzati sono stati utilizzati per la determinazione delle attività enzimatiche e del carbonio estraibile extracellulare.

Parametri chimici

Umidità

L'umidità è stata calcolata come differenza tra la massa di un campione fresco e la massa del medesimo campione dopo essiccazione a 105 °C per 24 ore ed è espressa in percentuale.

pH

Il pH è stato misurato sugli estratti acquosi (1:10) del campione.

Conducibilità elettrica

La conducibilità elettrica è stata determinata sugli estratti acquosi (1:10) dei campioni. I valori sono espressi come mS/cm.

Azoto ammoniacale

L'ammoniaca è stata determinata sugli estratti acquosi mediante l'elettrodo selettivo. La lettura è stata effettuata su 10ml di estratto acquoso, ai quali sono stati aggiunti 0,1ml di NaOH (10 M) per liberare l' NH_3 gassosa; la soluzione è stata mantenuta costantemente in agitazione tramite un agitatore magnetico.

Azoto totale

La determinazione dell'azoto totale è stata effettuata su 60-80 mg di campione setacciato molto fine, attraverso l'utilizzo di un analizzatore elementare FP-528 PROTEIN/NITROGEN DETERMINATOR. Il metodo era fondato sulla completa ed istantanea ossidazione del campione per "flash combustion" (900°C) con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi.

Tutte le forme di azoto sono state convertite (atmosfera ossidativa) in ossidi di azoto (NO_x), raccolte e ridotta ad azoto molecolare (N_2). Tra i prodotti della combustione erano presenti anche CO_2 e H_2O che sono stati eliminati grazie alla presenza di due trappole che ne consentivano la cattura.

La quantità dell'azoto è stata rilevata da una cella a conducibilità termica ed espressa in percentuale.

L'apparecchio è stato calibrato con EDTA con concentrazioni di azoto pari a 9,57%.

Carbonio organico totale

La determinazione del carbonio totale (frazione organica e frazione inorganica) è stata effettuata su 50-100 mg di materiale organico setacciato molto fine, attraverso l'utilizzo di un analizzatore elementare, RC-412 MULTIPHASE CARBON. Il metodo era fondato sulla completa ed istantanea ossidazione del campione per "flash combustion" con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi. Attraverso l'analisi del campione, in atmosfera ossidativa, tutte le forme di carbonio (ad eccezione di qualche carburo simile a SiC) sono state convertite in CO₂ e H₂O.

Il campione è stato introdotto all'interno di una fornace impostata per passare da una temperatura di 300°C a 950°C. Con l'aumentare della temperatura si aveva la combustione delle diverse forme del carbonio; per la parte organica il range di temperatura di ossidazione-volatilizzazione era compreso fra i 300°C e i 600°C, mentre per la frazione inorganica tra i 650°C e i 950°C. La CO₂ prodotta è stata trasportata tramite un flusso di ossigeno fino ad una cella IR, dove attraverso un sistema di spettrometria infrarossa lo strumento era in grado di determinare l'identità e la quantità delle molecole residenti all'interno della cella. Il quantitativo di carbonio è stato espresso in percentuale.

L'apparecchio è stato calibrato con EDTA con concentrazioni di carbonio pari a 40,9%.

Carbonio idrosolubile

Il carbonio idrosolubile è stato determinato sugli estratti acquosi. Quelli del primo campionamento, a causa dell'alto contenuto di carbonio, sono stati diluiti 1:5 con acqua bidistillata mentre quelli dei campionamenti successivi sono stati usati tal quali.

Prove: 2 ml di estratto + 1 ml di K₂Cr₂O₇ 2N + 2 ml di H₂SO₄ concentrato.

Le prove sono state riscaldate a 150°C per 2 ore. Una volta raffreddate si sono effettuate le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 590 nm contro un bianco ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali delle prove ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in µgC/g materiale organico, riferite ad una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (come glucosio), trattato nelle stesse condizioni.

Carbonio estraibile totale

Il carbonio estraibile totale è stato determinato sugli estratti in pirofosfato alcalino. A causa dell'alto contenuto di carbonio l'estratto è stato diluito con acqua bidistillata in rapporto 1:10.

Prove: 2ml di estratto + 1ml di K₂Cr₂O₇ 2N + 2 ml di H₂SO₄ concentrato

Le prove sono state riscaldate alla temperatura di 150°C per due ore. Dopo il raffreddamento sono state effettuate le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 590 nm, contro un bianco ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali delle prove ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in µgC/g di materiale organico mediante una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (come glucosio) trattato nelle stesse condizioni.

Carbonio fulvico (C-AF)

La determinazione degli acidi fulvici viene eseguita sull'estratto in pirofosfato alcalino trattato con H₂SO₄ concentrato fino al raggiungimento del valore 2 di pH. A questo pH infatti, gli acidi umici precipitano mentre gli acidi fulvici rimangono in soluzione. Gli estratti, essendo particolarmente ricchi di carbonio, sono stati diluiti 1:10 prima dell'acidificazione.

Prove: 2 ml di estratto + 1ml di K₂Cr₂O₇ 2N + 2 ml di H₂SO₄ concentrato

Le prove sono state scaldate alla temperatura di 150°C per due ore. Dopo raffreddamento sono state effettuate le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 590 nm, contro un bianco preparato nelle stesse condizioni sperimentali, ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state

trasformate in concentrazioni, espresse in $\mu\text{gC/g}$ di materiale organico mediante una retta standard ricavata da concentrazioni note di C-glucosio.

Carbonio umico (C-AU)

La determinazione è stata fatta per differenza tra il carbonio estraibile in PPI-NaOH 0,1M a pH 11 del campione e il carbonio di acidi fulvici dello stesso estratto.

Carbonio estraibile extracellulare

Il carbonio estraibile extracellulare è stato determinato sugli estratti in pirofosfato neutro vive e dializzati (frazione $>10^4$). Gli estratti sono stati diluiti 1:10 o 1:5 prima di procedere con l'analisi, a causa del loro alto contenuto di carbonio.

Prove: 2ml di estratto + 1ml di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 2N + 2ml di H_2SO_4

Le prove sono state riscaldate per 2 ore a 150°C . Una volta raffreddati si effettuano le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 590 nm, contro un bianco preparato nelle stesse condizioni sperimentali, ma in assenza di campione. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in $\mu\text{gC/g}$ di materiale organico mediante una retta standard ricavata da concentrazioni note di carbonio (come glucosio), trattato nelle stesse condizioni.

Fosforo totale

Il fosforo totale è stato misurato mettendo in tubi da idrolisi 0,5 g di campione secco e 5 ml di acido nitrico (HNO_3). Successivamente i tubi sono stati messi nel Block Digestor per 2 ore a 140°C . In seguito è stato aggiunto a freddo 1 ml di acido perclorico (HClO_4) e i campioni sono state sottoposti ad una seconda digestione a 180°C per circa 2 ore e $\frac{1}{2}$. Infine sono stati lasciati raffreddare, si sono aggiunti 1 ml HNO_3 per completare l'ossidazione della sostanza organica e si sono tenuti ancora 30 minuti a scaldare a 140°C . Dopo questa terza digestione i campioni sono stati portati a volume (50 ml) con acqua bidistillata, agitati e lasciati decantare. Quindi sono stati prelevati 0,5 ml di soluzione tal quale o opportunamente diluita (1:50) in base al contenuto di fosforo e poi aggiunta una

goccia della soluzione di P-nitrofenolo (0,25%) e, goccia a goccia, NaOH 5M fino al viraggio al giallo dell'indicatore. Successivamente sono stati aggiunti 1 ml di reattivo* specifico per il fosforo e portati a 5 ml con acqua bidistillata (in provette di plastica). A questo punto è stata effettuata la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 720 nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in g di P/g_{ss}, mediante una retta ottenuta con concentrazioni note di fosforo, trattato nello stesso modo dei campioni.

*Preparazione del reattivo:

Si aggiungono 1,5 g d'acido ascorbico a 100 ml della soluzione C.

Soluzione C: sono state mescolate le soluzioni A e B e poi aggiunti 10 ml di potassio antimonio tartrato allo 0,5%, il tutto è stato portato a un volume di 100 ml con acqua distillata.

Soluzione A: 12,5 ml di H₂SO₄ in 40 ml di H₂O.

Soluzione B: 1 g di molibdato di ammonio in 30 ml di H₂O e riscaldato a 60°C.

Metalli pesanti

L'analisi dei metalli pesanti è stata effettuata mettendo in tubi da idrolisi 0,5 g di campione secco e 5 ml di acido nitrico (HNO₃) che sono poi stati scaldati nel Block Digestor per 2 ore a 140°C. In seguito è stato aggiunto a freddo 1 ml di acido perclorico (HClO₄) e i campioni hanno subito una seconda digestione a 180°C per circa 2 ore e ½. Infine i campioni ancora umidi sono stati lasciati raffreddare e per completare l'ossidazione della materia organica è stato aggiunto un altro ml di HNO₃ ed è stata effettuata una terza digestione della durata di 30 minuti alla temperatura di 140°C. Una volta raffreddati, i campioni sono stati portati a volume (50 ml) con acqua bidistillata, agitati e lasciati decantare. In seguito è stata eseguita una filtrazione con membrana ultrarapida (WHATMAN ASHLESS FAST) e prelevata un'aliquota per l'analisi effettuata con la tecnica dell'assorbimento atomico.

Anioni

I nitrati, fosfati, solfati cloruri e fluoruri sono stati determinati sugli estratti acquosi mediante cromatografia ionica. Per la loro quantificazione sono state

preparate delle rette di taratura mediante l'impiego di soluzioni standard a concentrazione nota, nell'intervallo 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$. Le misure sono state espresse in μg di anione/g di materiale organico solido essiccato all'aria.

Parametri biochimici

Le attività enzimatiche sono stati determinati sul materiale organico e sugli estratti in pirofosfato neutro. Parallelamente alle prove sono stati eseguiti dei controlli in cui il campione è stato incubato nelle stesse condizioni delle prove, ma in assenza di substrato, aggiunto dopo l'incubazione. I controlli avevano lo scopo di determinare un'eventuale presenza di prodotto di reazione generato da reazioni non enzimatiche e di correggere, in tal caso, le misure. Nei saggi colorimetrici un'ulteriore correzione delle misure è stata ottenuta effettuando la prova del bianco, preparata con tampone e substrato, che permetteva di valutare l'eventuale idrolisi del substrato di reazione durante il periodo di incubazione. Il bianco, così preparato, è stato utilizzato per azzerare lo spettrofotometro.

Deidrogenasi

Le deidrogenasi sono enzimi intracellulari, appartenenti al gruppo delle ossidoreduttasi e catalizzano l'ossidazione di composti organici. Il substrato della reazione è costituito dalla sostanza organica, mentre il cofattore sintetico utilizzato per la misura dell'attività deidrogenasica è costituito dall'INT (*P-Iodio-Nitro-Tetrazolium-chloride*) che per riduzione forma un prodotto colorato, INTF (*p-Iodo-Nitro-Tetrazolium-Formazano*) determinabile per via spettrofotometrica. Questa attività enzimatica è stata determinata secondo il metodo messo a punto da Garcia et al., (1993).

I campioni sono stati preparati in provette di plastica da 10 ml.

Prove: 0,1g di materiale organico + 0,2ml di substrato INT allo 0,5% (in H₂O bidistillata) + 0,1ml d'acqua bidistillata (per portare il campione al 60% della capacità di campo).

Controlli: 0,1g di materiale organico + 0,3ml d'acqua bidistillata (per portare il campione al 60% della capacità di campo).

Prove e controlli sono stati lasciati riposare per 20 ore al buio; le provette non sono state tappate, perché l'INT prevale sull'ossigeno (il naturale substrato della deidrogenasi) nell'accettare gli elettroni. L'INTF, che è il prodotto della reazione di ossido-riduzione, è insolubile in acqua ed è stato estratto mediante aggiunta di 5ml di una soluzione estraente composta da tetracloroetilene e acetone (1:1,5). Il

tutto è stato agitato meccanicamente per circa 1 minuto, dopo di che centrifugato a 3500rpm per 10 minuti. Il sopranatante è stato usato per la lettura spettrofotometrica, previa diluizione con soluzione estraente per poter avere una lettura che rientri nella retta di taratura. Le letture spettrofotometriche sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 490 nm, contro un bianco contenente la sola soluzione estraente. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni, espresse in $\mu\text{gINTF/g}_{\text{ss}}\cdot\text{h}$, mediante una retta standard ottenuta con concentrazioni note d'INTF.

β -Glucosidasi

E' un enzima che indica il ciclo del carbonio, in quanto catalizza l'idrolisi del cellobiosio (dimero derivante dalla degradazione della cellulosa) a glucosio. La determinazione dell'attività di questo enzima si basa sul metodo di Masciandaro et al., (1994). Tale metodo consiste nella determinazione per via colorimetrica (lunghezza d'onda di 398nm) del rilascio del para-nitrofenolo (PNF), dopo l'incubazione dei campioni con para-nitrofenil-glucoside (PNG) (substrato di reazione).

Nelle provette di plastica da 10 ml sono stati preparati sia le prove che i controlli.

Materiale organico

Prove: 0,25g di materiale organico + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNG 0,05 M.

Controlli: 0,25g di materiale organico + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5.

Bianco: 2ml di tampone maleato 0,1 M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNG 0,05M

Estratti in pirofosfato neutro

Prove: 0,5ml di estratto + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNG 0,05M

Controlli: 0,5ml di estratto + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5.

Bianco: 0,5ml di acqua bidistillata + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNG 0,05M

Prove, controlli e bianco sono stati posti in agitazione in un bagno termostatico per 2 ore a 37°C. Una volta terminato il periodo d'incubazione, nei controlli sono stati aggiunti 0,5 ml di substrato (PNG) e tutti i campioni (prove, controlli e

bianco) sono stati posti a raffreddare a 4°C per 10 minuti per bloccare la reazione. Si aggiungono poi 0,5ml CaCl_2 0,5M (per la dispersione dei colloidi che interferirebbero con la lettura) e di 2ml di NaOH 0,5M (per salificare il prodotto, conferendogli un colore giallo). Si portava ad un volume finale di 10 ml con acqua bidistillata e in seguito si centrifugava per 10 minuti a 3500 rpm. Il sopranatante è stato letto allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 398nm. Le densità ottiche rilevate dallo strumento sono state trasformate in concentrazioni mediante una retta standard, ottenuta con concentrazioni note di PNF. I risultati sono stati espressi in $\mu\text{gPNF/g}_{\text{ss}}\cdot\text{h}$.

Fosfatasi

La fosfatasi catalizza l'idrolisi degli esteri fosforici a fosfato ed è, quindi, un enzima rappresentativo del ciclo del fosforo. Il metodo è basato sulla determinazione per via colorimetrica del Para-nitrofenolo (PNF), prodotto dall'idrolisi del para-nitrofenil-fosfato-esaidrato (PNP), che è il substrato impiegato in questo saggio enzimatico (Nannipieri et al., 1980).

Sono state utilizzate provette di plastica da 10 ml.

Materiale organico

Prove: 0,25g di materiale organico + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNP 0,12M

Controlli: 0,25g di materiale organico + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5.

Bianco: 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNP 0,12M

Estratti in pirofosfato neutro

Prove: 0,5ml di estratto + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNP 0,12M

Controlli: 0,5ml di estratto + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5.

Bianco: 0,5ml di acqua bidistillata + 2ml di tampone maleato 0,1M pH 6,5 + 0,5ml di substrato PNP 0,12M

I campioni sono stati posti in agitazione in un bagno termostatico per 1 ora e 30 minuti a 37°C. Una volta terminato il periodo d'incubazione, sono stati aggiunti anche ai controlli 0,5 ml di substrato (PNP) e posti a raffreddare a 4°C per 10 minuti, per bloccare la reazione. A questo punto sono stati aggiunti 0,5ml di CaCl_2

0,5M e 2ml di NaOH 0,5M e portati a 10ml con acqua bidistillata. Successivamente i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 3500 rpm. Il sopranatante è stato letto allo spettrofotometro contro il bianco ad una lunghezza d'onda di 398nm.

Le densità ottiche rilevate dallo strumento vengono trasformate in concentrazioni mediante una retta standard ottenuta con soluzioni di PNF a concentrazione nota. I risultati sono espressi in $\mu\text{g PNF/g}_{\text{ss}}\cdot\text{h}$.

Ureasi

L'ureasi è un enzima idrolitico presente in molte piante superiori, animali e in numerosi microrganismi e catalizza l'idrolisi dell'urea, un intermedio del ciclo dell'azoto, in ammoniaca e anidride carbonica.

La stima dell'attività ureasica si basa sulla determinazione dell'ammoniaca quale prodotto dell'idrolisi enzimatica dell'urea (Nannipieri et al., 1980).

In provette di plastica da 10ml sono stati preparati sia le prove sia i controlli.

Materiale organico

Prove: 0,5g di materiale organico + 2ml di tampone fosfato 0,1M pH 7 + 0,5ml di substrato urea 6,4%

Controlli: 0,5g di materiale organico + 2ml di tampone fosfato 0,1M pH 7.

Estratti in pirofosfato neutro

Prove: 1ml di estratto + 2ml di tampone fosfato 0,1M pH 7 + 0,5ml di substrato urea 6,4%

Controlli: 1ml di estratto + 2ml di tampone fosfato 0,1M pH 7.

Prove e controlli sono stati agitati in un bagno termostatico per 1 ora e 30 minuti, alla temperatura di 37°C. In seguito vengono portati ad volume finale di 10ml con acqua bidistillata e centrifugati per 10 minuti a 3500 rpm. L' NH_3 presente nel surnatante viene determinata mediante l'uso di un elettrodo selettivo. I risultati sono espressi come $\mu\text{g NH}_3/\text{g}_{\text{ss}}\cdot\text{h}$.

Proteasi-BAA

Le proteasi sono un gruppo di enzimi idrolitici legati al ciclo dell'azoto; esse hanno la funzione di catalizzare l'idrolisi di proteine in oligopeptidi o dipeptidi.

La proteasi BAA interviene, in particolare, nell'idrolisi di un peptide sintetico l'*N*- α -benzoil-L-arginammide idrocloruro monoidrato (BAA). L'attività viene misurata dalla concentrazione di NH_4^+ che viene liberata per deaminazione (Nannipieri et al., 1980).

L'ammoniaca liberata è determinata mediante l'elettrodo specifico per NH_3 .

Sono state utilizzate provette di plastica da 10ml.

Materiale organico

Prove: 0,5g di materiale organico + 2ml di tampone fosfato 0,1M a pH 7 + 0,5ml di substrato BAA (*N*- α -Benzoil-L- α -Arginammide-Hydrochloride) 0,03M.

Controlli: 0,5g di materiale organico + 2ml di tampone fosfato 0,1M a pH 7.

Estratti in pirofosfato neutro

Prove: 1ml di estratto + 2ml di tampone fosfato 0,1M pH 7 + 0,5ml di substrato BAA 0,03M

Controlli: 1ml di estratto + 2ml di tampone fosfato 0,1M pH 7.

Prove e controlli vengono messi ad agitare in bagno termostatico a 37°C per 1 ora e 30 minuti. Terminata l'incubazione, i campioni sono stati portati ad un volume finale di 10 ml con acqua bidistillata e centrifugati per 10 minuti a 3500 rpm. Il sovranatante è stato letto con l'elettrodo specifico per l'ammoniaca NH_3 .

I risultati sono espressi come $\mu\text{gNH}_3/\text{g}_{\text{ss}}\cdot\text{h}$.

Parametri biologici

Test di fito-tossicità

Il testo viene utilizzato per saggiare l'eventuale tossicità dei campioni sulla germinazione di semi di *Lepidium sativum*.

Le prove, compreso un controllo, sono eseguite in triplo. Sono state utilizzate delle piastre Petri su cui si pone della carta da filtro. Su ciascuna piastra si adagiano 10 semi di *Lepidium sativum* e si aggiungono 3ml di estratto acquoso. Per il controllo si hanno le stesse condizioni delle prove ma con acqua bidistillata.

L'esperimento viene condotto a temperatura ambiente e al buio per la durata di 72 ore. L'indice di germinazione si determina mediante la seguente formula:

$IG = G * L_m / L_o$, dove:

G è la percentuale di semi germinati rispetto al controllo: $n/n_c * 100$

L_m è la lunghezza media delle radici delle prove.

L_o è la lunghezza media delle radici del controllo.

Analisi Statistica

Tutti i risultati ottenuti rappresentano la media di tre replicati di campo. La significatività della media è espressa dalla deviazione standard. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata mediante il metodo delle componenti principali (PCA). E' stata inoltre costruita una matrice di correlazione di Pearson considerando tutti i parametri determinati; tutti i coefficienti di correlazione sono considerati significativi ad un valore $P < 0,05$.

Principi dell'analisi statistica multivariata delle componenti principali

L'analisi dei fanghi utilizzati nel corso della sperimentazione fornisce un set di dati articolato in cui ogni singola vasca viene ad essere caratterizzata da una molteplicità di parametri. In termini statistici ogni oggetto (vasca) è descritto da un insieme di p variabili (parametri chimici, fisici e biologici). Se si considera l'insieme delle misure su n vasche, i dati possono essere rappresentati in forma tabellare come una matrice X di dimensioni $n \times p$, le cui n righe rappresentano i diversi campioni e le cui p colonne corrispondono alle variabili che descrivono ogni campione.

Vista la dimensionalità elevata dell'insieme, sorge il problema di come trattare questi dati. Una delle tecniche più importanti per questo scopo è l'analisi delle componenti principali (PCA). La PCA consiste nel trasformare, attraverso complessi calcoli matriciali, le variabili originali (p) in nuove variabili ottenute come loro combinazione lineari, dette appunto componenti principali (PC). Ogni componente principale contiene una parte essenziale dell'informazione, cioè contribuisce alla varianza totale dell'insieme di dati. Questo permette di ridurre la dimensionalità dei dati e nel caso in cui si scelga un numero di componenti principali minori o uguale a 3 di avere una visualizzazione dei risultati statistici in uno spazio bi o tridimensionale.

In particolar modo, dall'applicazione di questa tecnica statistica si ottiene:

- ✓ La tabella dei loadings (visualizzabile anche in forma grafica): consente di analizzare il peso di ciascuna variabile iniziale nelle diverse componenti principali. Variabili con un valore prossimo allo 0 non risultano rilevanti per tale componente considerata; variabili

che si collocano agli estremi (± 1) di una componente sono invece variabili molto importanti per quella componente.

- ✓ Il grafico degli scores è una rappresentazione dei campioni nello spazio delle prime 2-3 componenti principali che consente di analizzare il comportamento degli oggetti nelle diverse componenti e la loro similarità. E' così possibile notare raggruppamenti di oggetti simili (clusters), la presenza di oggetti isolati (outliers), il manifestarsi di particolari distribuzioni.

Risultati e discussione

Parametri del processo.

pH

Durante il processo di fitostabilizzazione il pH presenta una tendenza a diminuire con valori compresi nel range 7,5-6,5. Molti studi convengono sul dire che questo è il valore ottimale per la crescita e lo sviluppo della *Phragmites* anche se sembra tollerare bene range di pH che vanno da 4,8 a 8,2 (Duke et al., 1978, 1979).

Diverse sono le ricerche, concordi con i nostri risultati, che hanno evidenziato una diminuzione di pH dei fanghi, successivamente allo spandimento su suoli a *Phragmites*, dovuta soprattutto alla produzione di acidi organici durante il processo di mineralizzazione (Siviera and Sommers, 1977; Epstein et al., 1976; LaHann, 1976).

| pH | | | | | | | | | | |
|---------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| giorni | 0 | dev.st | 30 | dev.st | 60 | dev.st | 90 | dev.st | 120 | dev.st |
| vasca 3 | 7,45 | ±0,7 | 7,22 | ±1,2 | 6,58 | ±0,6 | 6,96 | ±0,75 | 6,48 | ±0,6 |
| vasca 4 | 7,64 | ±0,5 | 7,27 | ±1,01 | 6,7 | ±0,7 | 6,97 | ±0,65 | 6,48 | ±0,7 |
| vasca 5 | 7,62 | ±0,6 | 6,96 | ±1,03 | 6,77 | ±0,7 | 6,84 | ±0,8 | 6,51 | ±0,68 |
| vasca 6 | 7,37 | ±0,7 | 7,54 | ±0,8 | 6,67 | ±0,6 | 6,94 | ±0,9 | 6,52 | ±0,7 |

| pH | | | | | | | | |
|---------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| giorni | 150 | dev.st | 180 | dev.st | 210 | dev.st | 240 | dev.st |
| vasca 3 | 6,5 | ±0,7 | 7,12 | ±0,6 | 6,8 | ±0,5 | 6,95 | ±0,5 |
| vasca 4 | 6,51 | ±0,6 | 7,02 | ±0,6 | 6,83 | ±0,65 | 6,62 | ±0,65 |
| vasca 5 | 6,51 | ±0,5 | 6,62 | ±0,5 | 6,55 | ±0,75 | 6,42 | ±0,6 |
| vasca 6 | 6,68 | ±0,6 | 6,96 | ±0,65 | 6,5 | ±0,6 | 6,53 | ±0,75 |

Tabella 4. Valori di pH nel corso della sperimentazione.

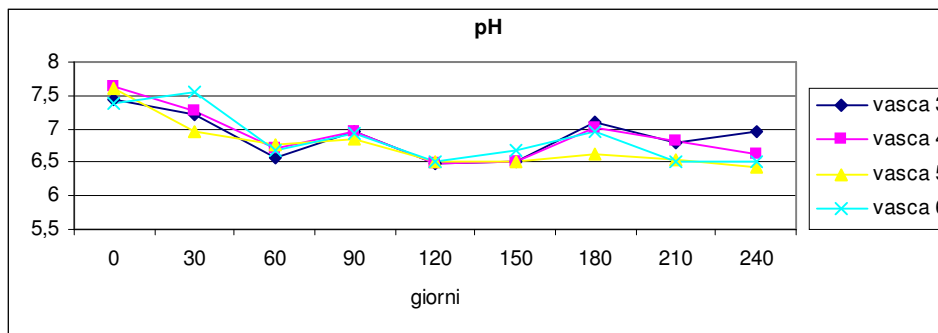


Figura 1. Andamento del pH durante la sperimentazione.

Conducibilità elettrica (C.E.)

Durante la sperimentazione la conducibilità aumenta in tutte le vasche in modo abbastanza uniforme raggiungendo valori di circa 3mS/cm. Questo andamento è probabilmente dovuto all'accumularsi nel tempo del fango sul fondo della vasca e al processo di mineralizzazione che porta alla mobilitazione dei nutrienti con conseguente aumento della loro concentrazione.

| Conducibilità elettrica (dS/m) | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| giorni | 0 | dev.st | 30 | dev.st | 60 | dev.st | 90 | dev.st | 120 | dev.st |
| vasca 3 | 0,65 | ±0,03 | 1,88 | ±0,09 | 0,98 | ±0,04 | 1,49 | ±0,08 | 1,9 | ±0,09 |
| vasca 4 | 0,74 | ±0,05 | 2,2 | ±0,11 | 1,29 | ±0,09 | 1,43 | ±0,08 | 1,92 | ±0,09 |
| vasca 5 | 0,75 | ±0,03 | 2,26 | ±0,11 | 1,34 | ±0,09 | 1,6 | ±0,8 | 1,79 | ±0,08 |
| vasca 6 | 0,89 | ±0,04 | 1,7 | ±0,09 | 1,62 | ±0,09 | 1,62 | ±0,09 | 1,59 | ±0,08 |

| Conducibilità elettrica (dS/m) | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| giorni | 150 | dev.st | 180 | dev.st | 210 | dev.st | 240 | dev.st |
| vasca 3 | 2 | ±0,11 | 3,55 | ±0,13 | 3 | ±0,15 | 3,21 | ±0,16 |
| vasca 4 | 1,98 | ±0,09 | 2,94 | ±0,13 | 3,04 | ±0,15 | 3,3 | ±0,16 |
| vasca 5 | 1,8 | ±0,09 | 2,32 | ±0,11 | 3,18 | ±0,15 | 3,12 | ±0,16 |
| vasca 6 | 1,62 | ±0,09 | 2,61 | ±0,11 | 3,18 | ±0,15 | 3,2 | ±0,15 |

Tabella 5 Valori della conducibilità elettrica durante la sperimentazione.

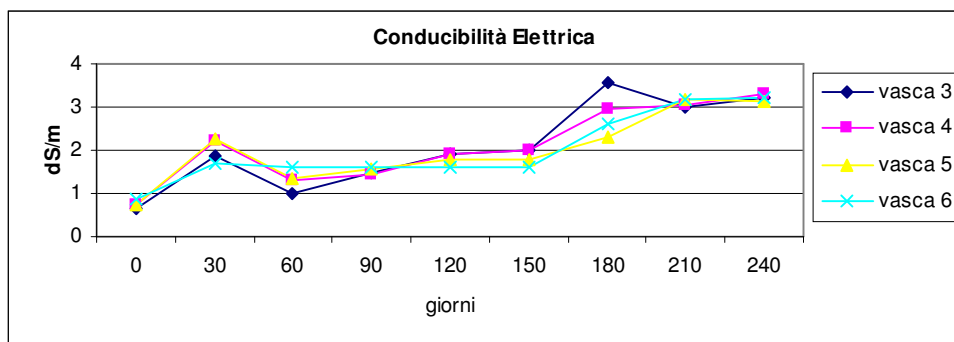


Figura 2 Andamento della conducibilità elettrica durante la sperimentazione.

Azoto organico totale

L'azoto è un elemento fondamentale per la crescita delle piante poiché è un costituente non solo delle proteine, ma anche degli acidi nucleici e del protoplasma. Nella nostra sperimentazione il tenore di azoto organico iniziale in tutte le vasche è circa il 5%. Nonostante le continue aggiunte di fango, alla fine del processo si osserva una flessione significativa ($p < 0,01$) che porta ad un valore di circa 4%. Gli andamenti nel tempo in tutte le vasche (fig.3) potrebbero essere dovuti all'efficacia del sistema di nitrificazione/denitrificazione al livello della rizosfera dove i batteri trasformano l'azoto ammoniacale in ossidi dell'azoto quali nitriti e nitrati (nitrificazione) che poi vengono decomposti in azoto gassoso che esce dal sistema (denitrificazione).

Da uno studio condotto da Stewart et al. (1975), la percentuale media di azoto dei fanghi biologici di alcuni depuratori "campione", si aggira intorno al 3,3%. Lo stesso autore sottolinea che il processo di digestione aumenta la percentuale di azoto totale nei fanghi; questo è dovuto alla riduzione del volume e conseguente concentrazione dei solidi organici. Per quanto riguarda l'azione delle *Phragmites australis* sui fanghi immessi nelle vasche, in tutti gli studi condotti nelle "constructed wetlands", troviamo risultati molto variabili per quanto riguarda la rimozione di azoto da parte delle piante. E' stato riportato che applicazioni di fango ai letti vegetati in dosi concentrate e frequenti nel tempo portano ad avere una percentuale bassa di azoto utilizzato dalle piante (Hinesly et al., 1971, 1972). Poiché la mancanza di ossigeno è il fattore limitante del processo, è ben noto che tutti questi tipi di impianti necessiterebbero di letti vegetati molto più estesi per poter maggiormente ridurre il tenore di azoto (Shierup et al., 1990).

| Azoto totale (%) | | | | | | | | |
|-------------------------|----------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st | 300 | dev.st |
| vasca 3 | 5,14 | ±0,01 | 5,42 | ±0,04 | 4,39 | ±0,01 | 4,6 | ±0,1 |
| vasca 4 | 5,15 | ±0,03 | 5,13 | ±0,01 | 4,64 | ±0,03 | 4,5 | ±0,4 |
| vasca 5 | 5,41 | ±0,04 | 4,87 | ±0,2 | 4,17 | ±0,04 | 4,4 | ±0,4 |
| vasca 6 | 5,52 | ±0,1 | 4,55 | ±0,1 | 4,43 | ±0,1 | 4,2 | ±0,4 |

Tabella 6 Valori dell'Azoto totale durante la sperimentazione

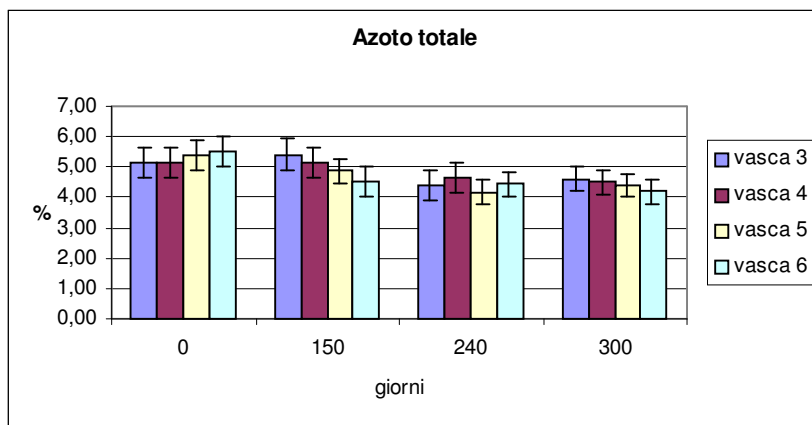


Figura 3 Andamento dell'Azoto totale durante la sperimentazione

Azoto ammoniacale

L'azoto contenuto nella matrice organica viene mineralizzato e convertito in azoto ammoniacale (Lutz, 1965). L'ammonio può essere utilizzato dalla pianta, oppure convertito in NO_3^- (nitrificazione) in condizioni aerobiche. Pertanto, in condizioni anaerobiche, l' NO_3^- viene trasformato in NH_3 (ammonificazione) processo più spinto rispetto alla nitrificazione (King, 1976). La sperimentazione ha evidenziato, in tutte le vasche, livelli di ammoniaca significativamente crescenti ($p < 0,01$) nel tempo (fig.4), indicando il probabile incremento di condizioni anaerobiche nei punti di prelievo dovute all'ispessimento dei fanghi. Questo viene confermato anche da una significativa diminuzione dei nitrati. Nonostante questo, lo sviluppo delle piante non è stato compromesso; infatti da studi condotti su diversi tipi di piante, al fine di descrivere la loro tolleranza ad alte concentrazioni di ammoniaca, risulta che la *Phragmites australis* ha una produzione in biomassa secca molto maggiore rispetto ad altre specie quali *Typha latifolia* e *Sagittaria latifolia* (Hill, et al., 1997).

| Azoto ammoniacale ($\mu\text{g NH}_3/\text{g}_{\text{ss}}$) | | | | | | | | |
|---|-----|----------|------|-----------|-----|----------|------|-----------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st | 300 | dev.st |
| vasca 3 | 354 | $30 \pm$ | 808 | ± 78 | 747 | ± 73 | 1636 | ± 150 |
| vasca 4 | 156 | ± 15 | 610 | ± 60 | 566 | ± 55 | 1216 | ± 120 |
| vasca 5 | 300 | ± 28 | 650 | ± 64 | 627 | ± 62 | 1323 | ± 130 |
| vasca 6 | 393 | ± 38 | 1178 | ± 100 | 841 | ± 83 | 1677 | ± 160 |

Tabella 7 Valori dell'Azoto ammoniacale durante la sperimentazione

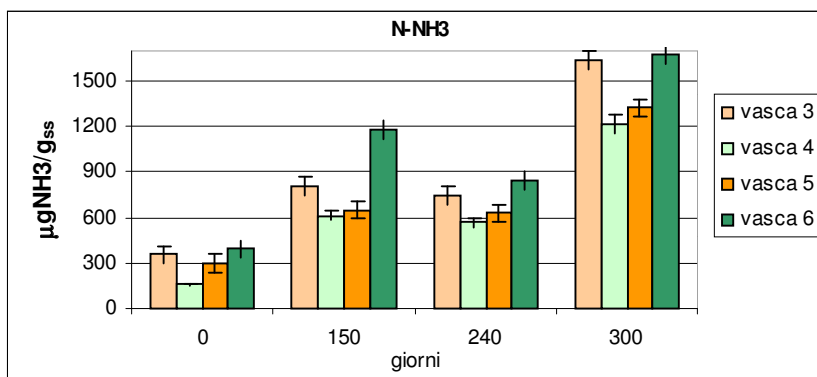


Figura 4 Andamento dell'Azoto ammoniacale durante la sperimentazione

Fosforo totale

Il fosforo è un nutriente essenziale per lo sviluppo delle piante e viene considerato poco disponibile nei suoli e nelle matrici organiche. L'acqua di infiltrazione è il mezzo attraverso il quale questo elemento viene trasportato e ciò avviene in due forme: sia come P "assorbito" dalle particelle del fango, sia come ortofosfato solubile.

All'interno dei letti di fitostabilizzazione il fosforo tende a diminuire nei primi mesi, per poi aumentare significativamente nel mese di Agosto e decrescere nuovamente alla fine ($p < 0,01$) (fig.5). La diminuzione iniziale potrebbe essere dovuta all'attività delle piante e dei microrganismi che utilizzano principalmente la forma minerale del P, il fosfato. L'assorbimento dei fosfati, come il resto delle attività svolte dalle macrofite, avviene a livello del sistema radicale che, affondato nel substrato, promuove una serie di processi atti alla depurazione incrementando la degradazione aerobica (Hardey, 2001) e lo scambio di sostanze con il fango. Inoltre, il P si può legare al Fe, Al, Ca ma anche alla sostanza organica. Probabilmente nei primi mesi questo genere di rimozione ha fatto sì che i letti vegetati funzionassero senza problemi nell'allontanamento delle varie forme di P. Infatti è stato dimostrato che in letti e vasche con strati drenanti, ricchi in Al, Ca e Fe, la rimozione del fosforo può raggiungere il 75% (Vyzamal, 1996).

L'aumento registrato nel mese di Agosto può essere imputato al basso tenore pluviometrico che caratterizza i mesi estivi, con conseguente scarsa lisciviazione e percolazione di acqua. Le continue immissioni di fango nei letti dell'impianto favoriscono, quindi, il processo di accumulo del fosforo rispetto a quello di rimozione.

| P totale ($\mu\text{g P/g}_{ss}$) | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 18599 | ± 1 | 13260 | ± 349 | 30434 | ± 3632 | 24709 | ± 3385 |
| vasca 4 | 20361 | ± 1353 | 13361 | ± 971 | 24390 | ± 783 | 21889 | ± 1034 |
| vasca 5 | 18599 | ± 285 | 14234 | ± 210 | 25700 | ± 1353 | 21956 | ± 2038 |
| vasca 6 | 19555 | ± 1068 | 13629 | ± 1267 | 22678 | ± 1496 | 20009 | ± 570 |

Tabella 8 Valori del Fosforo totale durante la sperimentazione

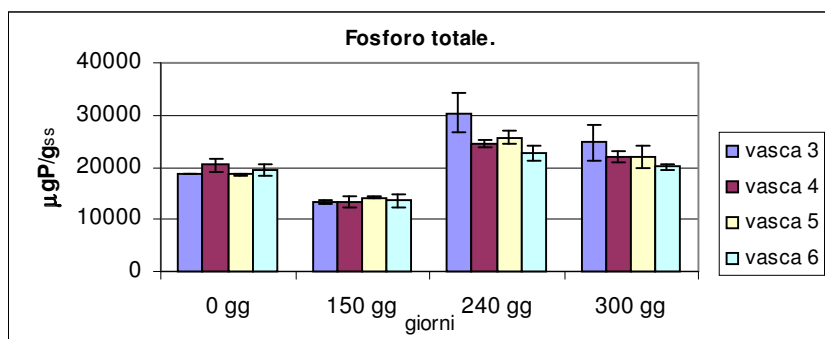


Figura 5. Andamento del Fosforo totale durante la sperimentazione.

Anioni e cationi

Nitrati e nitriti, sono composti inorganici dell'azoto presenti nei fanghi e soggetti a parecchi tipi di processi:

- possono essere assorbiti dalle piante in fase di crescita;
- possono essere assimilati dai microrganismi e così riportati nella riserva di azoto organico;
- possono essere convertiti in composti volatili o possono essere dilavati.

La denitrificazione, cioè la riduzione dei nitrati ad ossido nitroso ed ad azoto gassoso, avviene in presenza di una popolazione microbica attiva, in condizioni non troppo acide (solitamente sopra pH 5) e di scarsa aerazione, con sostanza organica fresca e decomponibile. La nitrificazione e la denitrificazione possono avvenire simultaneamente; nella sperimentazione i loro valori sono ridottissimi in tutte le vasche ad esclusione della 6 dove l'aumento, sia dei nitrati che dei nitriti, è evidente nelle ultime fasi del processo. I fosfati seguono l'andamento del P, terminando il processo con valori più alti rispetto all'inizio. I cloruri tendono ad aumentare nel tempo

| Nitrati (mg/l) | | | | | | | | |
|----------------|------|--------|------|--------|-------|---------|--------|---------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 7,1 | ±0 | 12,3 | ±0 | 0,0 | ±0 | 17,4 | ±2 |
| vasca 4 | 11,5 | ±0 | 10,0 | ±0 | 0,0 | ±0 | 3,5 | ±3 |
| vasca 5 | 10,4 | ±0 | 9,8 | ±0 | 173,7 | ±53 | 21,5 | ±5 |
| vasca 6 | 11,9 | ±2 | 71,2 | ±5 | 343,8 | ±32 | 1646,3 | ±31,8 |

Tabella 9 Andamento dei nitrati nel tempo

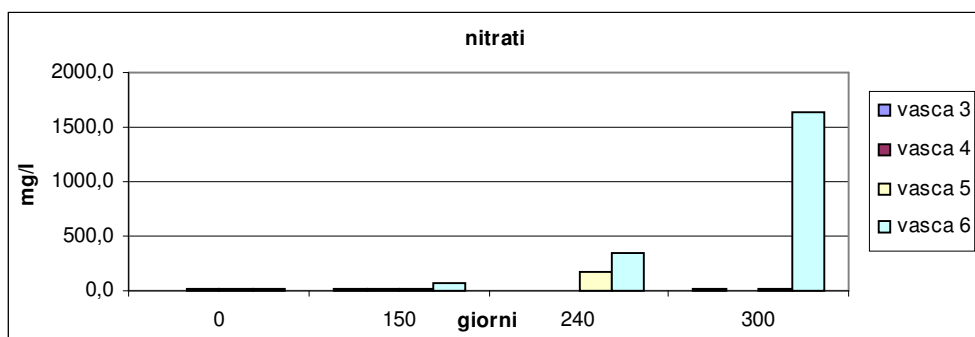


Figura 6 Andamento dei nitrati nel tempo.

| Nitriti (mg/l) | | | | | | | | |
|----------------|-------|--------|------|--------|-------|---------|-----|---------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 7,10 | ±0 | 0 | ±0 | 0 | ±0 | 0 | ±0 |
| vasca 4 | 19,93 | ±0,5 | 8,26 | ±0 | 0 | ±0 | 0 | ±0 |
| vasca 5 | 10,95 | ±1,2 | 4,63 | ±0 | 63,1 | ±0 | 0 | ±0 |
| vasca 6 | 0 | ±0 | 149 | ±32 | 352,9 | ±0 | 476 | ±31,8 |

Tabella 10 Andamento dei nitriti nel tempo.

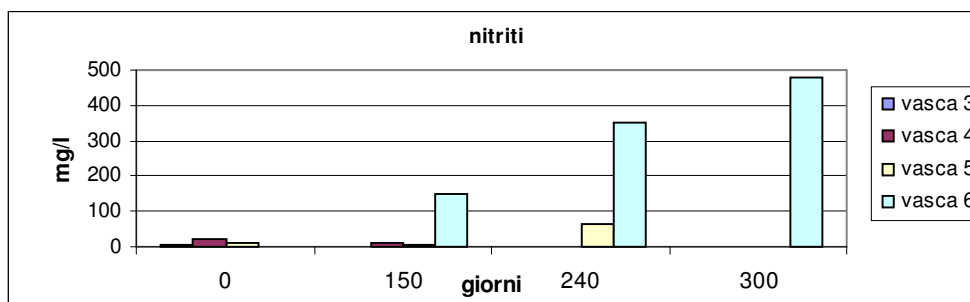


Figura 7 Andamento dei nitriti nel tempo.

| Cloruri(mg/l) | | | | | | | | |
|---------------|----------|--------|----------|--------|----------|---------|----------|---------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 132,394 | ±18 | 1468,842 | ±12 | 2755,808 | ±13,2 | 3345,403 | ±20 |
| vasca 4 | 226,8271 | ±39, | 1409,021 | ±39,9 | 2888,18 | ±39,9 | 3307,71 | ±39,9 |
| vasca 5 | 168,7568 | ±55,8 | 1711,179 | ±53 | 3113,506 | ±53 | 2943,656 | ±52,8 |
| vasca 6 | 245,6969 | ±32,8 | 1129,644 | ±33 | 3382,482 | ±32 | 1814,762 | ±31,8 |

Tabella 11 Andamento dei cloruri nel tempo.

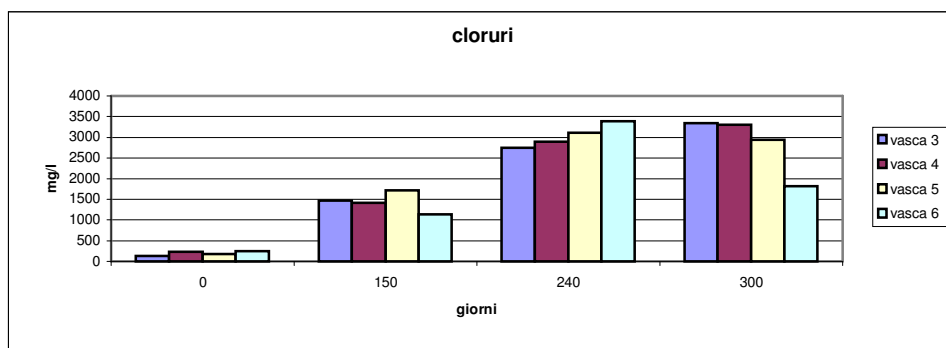


Figura 8 Andamento dei cloruri nel tempo.

| Fosfati(mg/l) | | | | | | | | |
|---------------|----------|--------|----------|--------|----------|---------|----------|---------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 721,5131 | ±39,9 | 4878,423 | ±530 | 1374,416 | ±131,2 | 2364,26 | ±290 |
| vasca 4 | 1042,779 | ±53 | 2815,744 | ±320 | 1324,163 | ±392,9 | 3689,913 | ±391,9 |
| vasca 5 | 1291,615 | ±52,8 | 2000,223 | ±390,9 | 1310,252 | ±320 | 2201,53 | ±522,8 |
| vasca 6 | 929,6586 | ±32 | 943,0131 | ±52,8 | 943,6965 | ±232 | 575,4166 | ±31,8 |

Tabella 12 Andamento dei fosfati nel tempo.

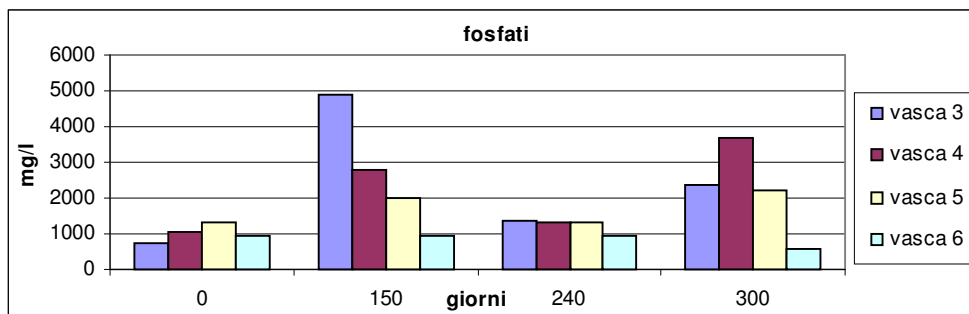


Figura 9 Andamento dei fosfati nel tempo.

| Solfati (mg/l) | | | | | | | | |
|----------------|----------|--------|----------|--------|----------|---------|----------|---------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 4081,682 | ±530 | 2737,226 | ±131,2 | 5728,398 | ±13,2 | 2809,363 | ±20 |
| vasca 4 | 4489,622 | ±320 | 2827,67 | ±392,9 | 5775,39 | ±39,9 | 4796,441 | ±39,9 |
| vasca 5 | 3668,294 | ±232 | 3650,418 | ±153 | 5826,455 | ±53 | 3586,65 | ±52,8 |
| vasca 6 | 3477,394 | ±320 | 2566,165 | ±232 | 8477,79 | ±32 | 4412,223 | ±31,8 |

Tabella 13 Andamento dei solfati nel tempo.

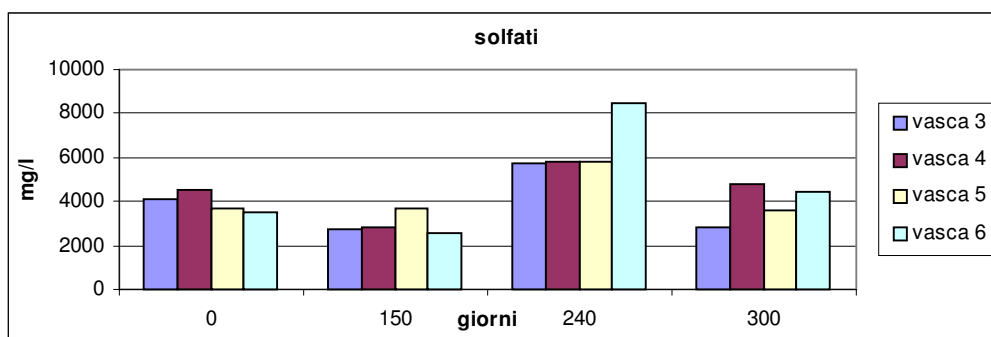


Figura 10 Andamento dei solfati nel tempo.

Carbonio organico totale

Il carbonio organico totale presenta un decremento significativo nel tempo ($p < 0,01$) in tutte le vasche (da una percentuale iniziale del 33-34% si arriva ad un intervallo finale che oscilla tra il 29,4 ed il 34%). Questa riduzione è dovuta all'efficienza dei processi di mineralizzazione della sostanza organica, all'interno dei letti, ad opera delle radici delle *Phragmites australis* e dei microrganismi, con conseguente rilascio della CO_2 in atmosfera (Elvira et al. 1996). E' noto che la somministrazione di fanghi biologici all'interno delle vasche determini un accumulo di materia organica la cui decomposizione avviene più facilmente quando le dosi e la frequenza degli sversamenti non sono elevati (Sommers et al., 1979). Nel nostro studio la quantità di fango immessa nelle vasche ad ogni sversamento è stata di circa 4-5 mc per vasca e la frequenza degli sversamenti è stata abbastanza elevata. Nonostante tre settimane prima del campionamento le immissioni di fango si interrompessero, il sistema di fitostabilizzazione deve essere considerato come un processo dinamico con un ingresso continuo di materiali freschi; i tempi necessari alla mineralizzazione della sostanza organica sono più lunghi rispetto ad altri tipi di processi stazionari (compostaggio), in cui non arrivano nuovi substrati. Proprio per questo assume importanza maggiore la riduzione osservata per il carbonio

| Carbonio organico totale ($\mu\text{gC/g}_{\text{ss}}$) | | | | | | | | |
|---|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | Dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 34,3 | ± 3 | 38,6 | $\pm 3,4$ | 31,7 | $\pm 3,2$ | 32,9 | $\pm 3,4$ |
| vasca 4 | 34,7 | ± 3 | 34,7 | $\pm 3,3$ | 32,5 | ± 3 | 34,3 | ± 3 |
| vasca 5 | 33,1 | $\pm 3,4$ | 33,1 | $\pm 3,8$ | 30,9 | $\pm 3,1$ | 30,2 | $\pm 3,3$ |
| vasca 6 | 35,2 | $\pm 3,5$ | 35,2 | $\pm 3,5$ | 30,2 | $\pm 3,0$ | 29,4 | $\pm 2,9$ |

Tabella 14 Valori del Carbonio organico totale durante la sperimentazione.

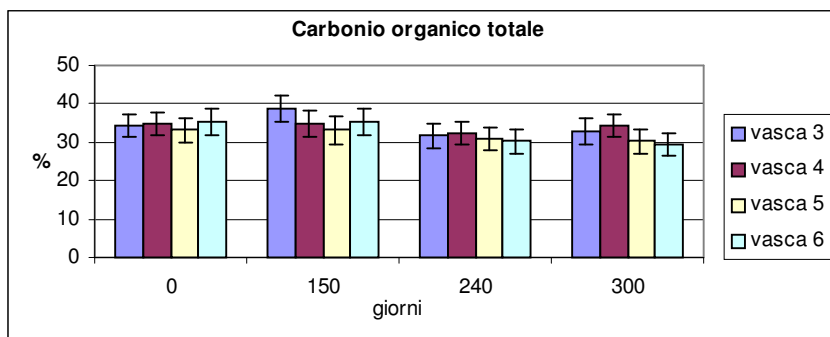


Figura 11 Andamento del Carbonio organico totale durante la sperimentazione.

Carbonio idrosolubile

Il carbonio idrosolubile è rappresentato dalla frazione del carbonio totale prontamente disponibile per i microrganismi. Significativo a livello statistico è il picco raggiunto nel secondo campionamento (Maggio) dovuto, probabilmente, all'accumulo di fanghi, responsabili del rilascio di una notevole quantità di carbonio idrosolubile immesso nei cinque mesi di sperimentazione. Questi substrati vengono immediatamente utilizzati dalle piante e dai microrganismi durante il periodo primaverile-estivo, caratterizzato da un elevato sviluppo vegetativo delle *Phragmites australis* (Cooper et al., 1996), dimostrato anche dalla densità di piante raggiunta nei letti di fitostabilizzazione. I microrganismi consumano i composti facilmente metabolizzabili e ciò porta ad un loro rapido esaurimento. Alla fine del processo di stabilizzazione, si trovano valori di concentrazioni del carbonio idrosolubile significativamente minori rispetto ai valori iniziali, come già osservato per il carbonio organico totale.

| Carbonio idrosolubile ($\mu\text{gC/g}_{\text{ss}}$) | | | | | | | | |
|--|-------|------------|-------|------------|-------|-----------|-------|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 25914 | ± 341 | 70180 | ± 1138 | 17910 | ± 425 | 22655 | ± 997 |
| vasca 4 | 22936 | ± 1062 | 57141 | ± 1062 | 20497 | ± 15 | 21868 | ± 1425 |
| vasca 5 | 26102 | ± 228 | 56604 | ± 607 | 13896 | ± 243 | 23263 | ± 1816 |
| vasca 6 | 25539 | ± 949 | 75600 | ± 2428 | 18468 | ± 121 | 16574 | ± 372 |

Tabella 15 Valori del Carbonio idrosolubile durante la sperimentazione.

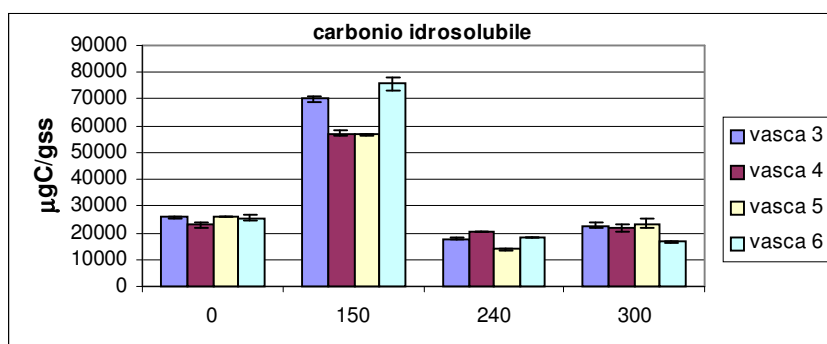
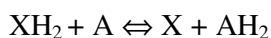


Figura 12 Andamento del Carbonio idrosolubile durante la sperimentazione.

Attività enzimatiche

Deidrogenasi

L'attività deidrogenasica, anche in sistemi biologici particolari come i fanghi derivanti da processi di depurazione delle acque, viene usata per stimare l'attività microbica totale (Garcia et al., 1997; Masciandaro et al., 2000). Questo enzima è intracellulare ed è legato ai processi di fosforilazione ossidativa che avvengono all'interno delle cellule microbiche (Trevors, 1984; Alef, 1991). Le deidrogenasi catalizzano l'ossidazione di composti organici con separazione di due atomi di idrogeno che sono trasferiti alla molecola del NAD^+ o NADP^+ . Il processo della deidrogenazione può essere così riassunto:



dove XH_2 è un composto organico donatore di idrogeno e A è l'accettore.

La sperimentazione inizia con valori di attività deidrogenasica elevati, che raggiungono livelli decisamente più alti dopo qualche mese, per poi stabilizzarsi su valori molto bassi alla fine del processo (fig.8). Questo indica un'elevata attività microbica iniziale, dovuta alle aggiunte di materiale degradabile fresco e quindi all'alta concentrazione di carbonio idrosolubile prontamente disponibile. I due parametri risultano, infatti, correlati positivamente ($p < 0,01$) Tab (37). Questo conferma che l'attività deidrogenasica può essere un valido indicatore dello stato e dell'evoluzione della sostanza organica (Benitez et al., 1998). Risultati simili si riscontrano anche in studi su suoli trattati con fanghi biologici, dove la massima attività deidrogenasica si manifesta nel periodo iniziale e diminuisce nel tempo a causa della minor disponibilità di substrati freschi e facilmente degradabili (Saviozzi et al., 2002). Inoltre, Baath (1989) e Pontes (2002) hanno riportato che la riduzione dell'attività di questo enzima è dovuta all'accumulo di metalli pesanti presenti nei fanghi in uscita dal depuratore e all'ambiente in cui i microrganismi operavano, particolarmente stressato a causa delle frequenti immissioni di fango (Reddy et al., 1987)

| Deidrogenasi ($\mu\text{gINTF/g}_{ss} \cdot \text{h}$) | | | | | | | | |
|--|------|------------|-----|------------|------|------------|------|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 91,9 | $\pm 11,9$ | 174 | $\pm 17,7$ | 19,8 | $\pm 5,57$ | 42,7 | $\pm 1,74$ |
| vasca 4 | 119 | $\pm 8,37$ | 191 | $\pm 18,8$ | 58,2 | $\pm 3,85$ | 45,7 | $\pm 1,74$ |
| vasca 5 | 112 | $\pm 13,5$ | 201 | $\pm 1,50$ | 19,3 | $\pm 1,71$ | 64,4 | $\pm 3,13$ |
| vasca 6 | 126 | $\pm 12,8$ | 169 | $\pm 32,5$ | 32,4 | $\pm 8,70$ | 35,1 | $\pm 2,09$ |

Tabella 16 Valori dell' attività deidrogenasica durante la sperimentazione

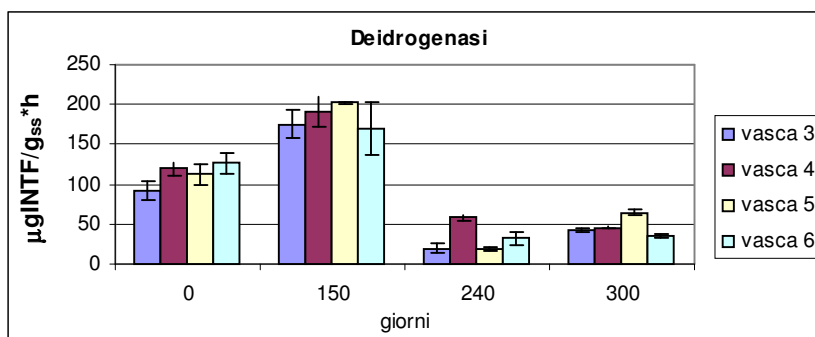
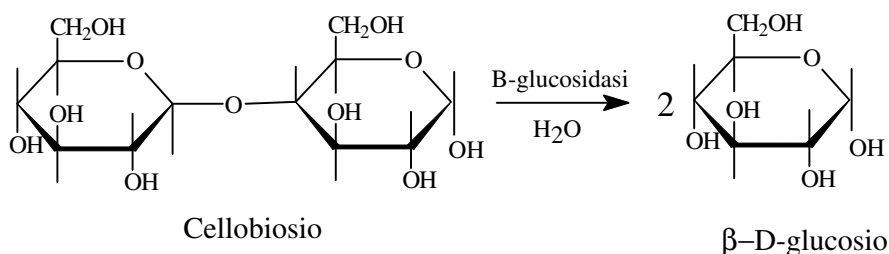


Figura 13 Andamento dell' attività deidrogenasica durante la sperimentazione

β -glucosidasi totale

La β -glucosidasi è un enzima del ciclo del carbonio dato che è coinvolto nella degradazione microbica della cellulosa a glucosio (Alef and Nannipieri, 1995). La β -glucosidasi idrolizza i gruppi terminali non riducenti del cellobiosio liberando β -D-glucosio, secondo lo schema di reazione seguente.



L'enzima riflette pertanto lo stato della materia organica nei fanghi e la sua attività è strettamente legata alla presenza di composti del carbonio. Come per la deidrogenasi, è evidente un notevole aumento di attività in tutte le vasche dopo diversi mesi dall'inizio della sperimentazione (fig.9). Questo aumento è dovuto all'induzione dell'attività microbica da parte dell'alta concentrazione dei composti facilmente assimilabili presenti nel mezzo, mentre il successivo calo dell'attività può essere attribuito al consumo della materia organica facilmente metabolizzabile. A questo enzima risultano correlati positivamente in tutte le vasche l'attività deidrogenasica, il carbonio organico totale, il carbonio idrosolubile e gli acidi fulvici. I risultati sono in accordo con lo studio di Sastre et al., (1996) che sottolinea anche la stretta correlazione dell'attività glucosidasica con la sostanza umica.

| β-glucosidasi ($\mu\text{gPNF/g}_{ss} \cdot \text{h}$) | | | | | | | | |
|---|--------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|
| giorni | 0 gg | dev.st | 150 gg | dev.st | 240 gg | Dev.st. | 300 gg | dev.st. |
| vasca 3 | 749 | $\pm 27,6$ | 1249 | $\pm 32,9$ | 454 | $\pm 14,8$ | 204 | $\pm 5,8$ |
| vasca 4 | 913 | ± 102 | 1307 | $\pm 8,5$ | 628 | $\pm 38,2$ | 183 | $\pm 23,3$ |
| vasca 5 | 801 | $\pm 24,4$ | 1130 | $\pm 14,8$ | 444 | $\pm 18,0$ | 136 | $\pm 11,1$ |
| vasca 6 | 1043,9 | $\pm 37,0$ | 1014,2 | $\pm 30,7$ | 368,0 | $\pm 43,5$ | 99,7 | $\pm 5,2$ |

Tabella 17 Valori della β -glucosidasi durante la sperimentazione

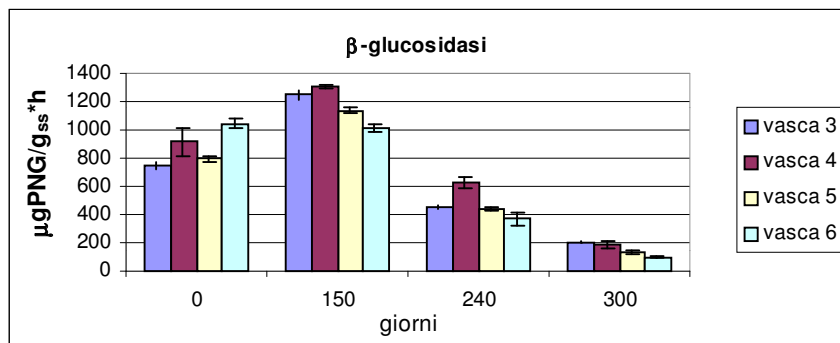
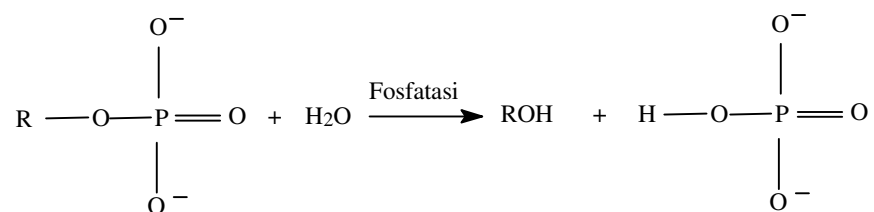


Figura 14 Andamento dell'attività β -glucosidasi durante la sperimentazione

Fosfatasi totale

Con il termine fosfatasi viene indicato un gruppo di enzimi che catalizza l'idrolisi degli esteri fosforici a fosfato, secondo il seguente schema di reazione:



Questi enzimi rivestono nel terreno una particolare importanza, perché svolgono un ruolo fondamentale nella mineralizzazione dei composti organici del fosforo, a fosforo minerale, rendendolo disponibile per la nutrizione delle piante. Sono enzimi con una bassa specificità, quindi capaci di catalizzare un elevato numero di substrati diversi (Alef et al. 1995).

L'andamento di questa attività è crescente per la maggior parte del periodo di sperimentazione e poi decresce nella fase finale, forse a causa di una diminuzione di substrati specifici, ma con valori sempre maggiori rispetto a quelli iniziali. I fanghi civili contengono composti organici del fosforo, anche inquinanti, e nei mesi di massimo accumulo di questi elementi si ha una maggior stimolazione dell'attività microbica e di conseguenza la sintesi dell'enzima (Nannipieri et al., 1988). In generale comunque la maggior parte degli autori sono concordi sulla riduzione dell'attività fosfataseica dovuta proprio ai fosfati contenuti nei fanghi (Lima et al., 1995), altri sostengono che lo stimolo ottenuto dall'immissione di materia organica può mascherare un effetto inibitorio di questa attività dovuto alla presenza di metalli pesanti (Juma & Tabatabai 1977)

| | Fosfatasi ($\mu\text{gPNF/g}_{ss} \cdot \text{h}$) | | | | | | | |
|---------|--|------------|--------|-----------|--------|-------------|--------|------------|
| | 0 gg | dev.st | 150 gg | dev.st | 240 gg | Dev.st. | 300 gg | dev.st. |
| vasca 3 | 624 | $\pm 92,7$ | 3512 | ± 120 | 4112 | $\pm 35,3$ | 1661 | $\pm 2,8$ |
| vasca 4 | 637 | $\pm 29,0$ | 4407 | ± 311 | 4732 | $\pm 176,7$ | 2844 | ± 155 |
| vasca 5 | 524 | $\pm 7,1$ | 3362 | ± 318 | 5456 | $\pm 0,8$ | 2054 | $\pm 56,5$ |
| vasca 6 | 644 | $\pm 17,2$ | 4212 | ± 148 | 7236 | $\pm 98,9$ | 1926 | ± 17 |

Tabella 18 Valori della fosfatasi durante la sperimentazione

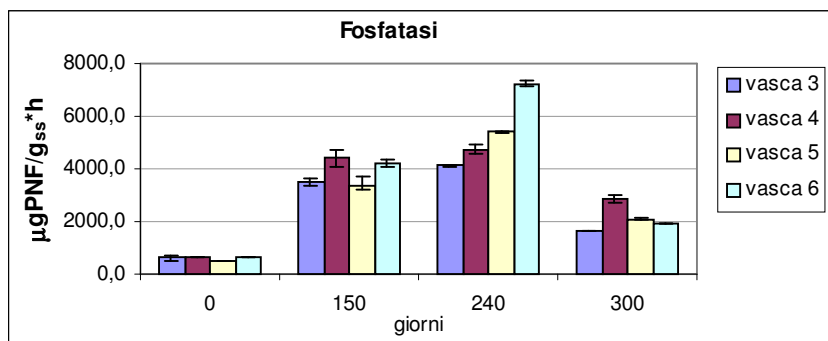
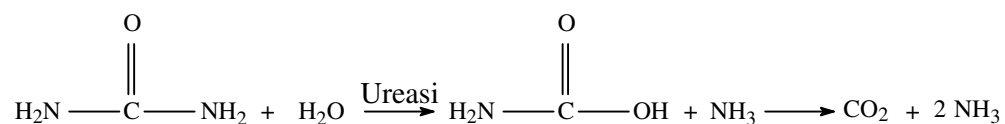


Figura 15 Andamento dell'attività fosfatasica durante la sperimentazione

Ureasi totale

L'Ureasi è un enzima presente in molte piante superiori e in numerosi microrganismi, soprattutto batteri, dove viene utilizzato per catalizzare l'idrolisi dell'urea, un intermedio chiave del ciclo dell'azoto che porta alla formazione dei prodotti terminali di reazione CO_2 e NH_3 . Il meccanismo di reazione è basato sulla formazione di una molecola di carbammato, come intermedio, secondo il seguente schema di reazione:



(Tabatabai, 1995).

L'ureasi è strettamente legata al ciclo dell'azoto nel suolo e nelle matrici organiche.

Nel nostro caso risulta significativo l'andamento decrescente nel tempo di questa attività, mentre, dall'analisi della varianza, non si riscontrano differenze significative tra le diverse vasche. Ureasi e N-NH_3 sono correlate negativamente; l'alta concentrazione di N-NH_3 presente nei fanghi potrebbe inibire l'attività dell'enzima (Moble et al., 1989). Concordi con i nostri risultati gli studi di Saviozzi et al. (1998) e di Bonmati et al. (1985), i quali sostengono che, con la somministrazione di ingenti dosi di fanghi sul suolo, si osserva, dopo alti valori iniziali, un decremento di attività ureasica; questo può essere dovuto all'effetto tossico di sostanze indesiderate presenti nei fanghi come i metalli pesanti, il cui effetto inibitorio è noto, oppure all'accumulo di ammoniaca che non riesce ad essere nitrificata. Altri autori rilevano invece un incremento dell'attività ureasica proporzionale alle dosi di fango aggiunte, fonti di carbonio e nutrienti, che stimolano anche la crescita di microrganismi ureolitici (Frankenberger et al., 1983, Lloyd et al., 1973)

| giorni | Ureasi ($\mu\text{gNH}_3/\text{g}_{\text{ss}} \cdot \text{h}$) | | | | | | | |
|---------|--|------------|------|------------|-----|-----------|-----|------------|
| | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 1561 | ± 471 | 669 | $\pm 67,2$ | 826 | $\pm 5,0$ | 255 | $\pm 25,5$ |
| vasca 4 | 1632 | $\pm 18,0$ | 667 | $\pm 12,8$ | 921 | $\pm 9,9$ | 413 | $\pm 16,8$ |
| vasca 5 | 1161 | ± 175 | 807 | $\pm 73,3$ | 772 | $\pm 7,9$ | 648 | $\pm 4,3$ |
| vasca 6 | 1064 | $\pm 41,9$ | 1041 | $\pm 42,2$ | 705 | $\pm 8,4$ | 651 | $\pm 20,4$ |

Tabella 19 Valori dell'ureasi durante la sperimentazione

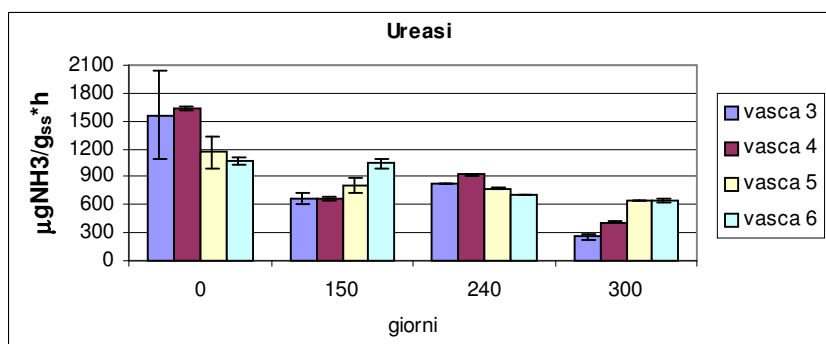


Figura 16 Andamento dell'attività ureasica durante la sperimentazione

Proteasi-BAA totale

Le proteasi sono una classe di enzimi che catalizzano l'idrolisi di proteine in peptidi, poi idrolizzati da peptidasi in amminoacidi. Tali enzimi giocano un ruolo importante nel ciclo dell'azoto; esse hanno la funzione di catalizzare l'idrolisi di proteine, oligopeptidi e dipeptidi fino alla trasformazione dell'azoto proteico in azoto ammoniacale, permettendo un suo assorbimento da parte delle radici delle piante. Nel corso della sperimentazione si osservano valori di questa attività significativamente crescenti ($p < 0,01$). La presenza e la continua immissione di substrati ricchi in azoto disponibile induce la sintesi di questo enzima (Saviozzi et al., 2002). Inoltre la composizione chimica-fisica dei fanghi e la rizosfera, con le sue popolazioni microbiche, costituiscono una fonte importante di proteine disponibili e di substrati specifici per questi enzimi (Skujins 1978).

| | Proteasi ($\mu\text{gBAA/g}_{\text{ss}} \cdot \text{h}$) | | | | | | | |
|---------|--|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|
| | 0 | dev.st. | 150 | dev.st. | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 282,9 | $\pm 26,5$ | 122,7 | $\pm 48,9$ | 362,9 | $\pm 14,3$ | 189,4 | $\pm 18,7$ |
| vasca 4 | 167,4 | $\pm 28,8$ | 90,4 | $\pm 3,6$ | 426,3 | $\pm 6,9$ | 238,6 | $\pm 42,7$ |
| vasca 5 | 145,2 | $\pm 10,2$ | 204,5 | $\pm 1,3$ | 245,8 | $\pm 7,1$ | 550,4 | $\pm 67,6$ |
| vasca 6 | 173,3 | $\pm 33,0$ | 435,0 | $\pm 7,3$ | 275,9 | $\pm 11,5$ | 496,7 | $\pm 14,4$ |

Tabella 20 Valori dell'attività proteasica totale durante la sperimentazione.

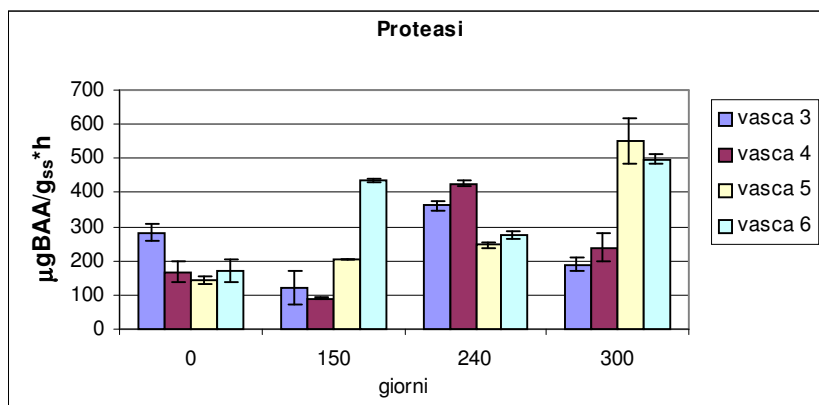


Figura 17 Andamento dell'attività proteasica totale durante la sperimentazione.

Parametri dell'umificazione

I parametri dell'umificazione comprendono il carbonio estraibile totale (sostanza umica), il carbonio fulvico, il carbonio umico, il carbonio estraibile extracellulare e le attività enzimatiche extracellulari. Il carbonio estraibile totale, il carbonio fulvico e umico, vengono determinati su estratti in pirofosfato alcalino (pH 11) che garantisce la massima estrazione della sostanza umica.

Il carbonio estraibile extracellulare viene determinato sugli estratti in pirofosfato neutro (pH 7), condizione in cui viene estratta quantitativamente meno sostanza umica ma quella estratta conserva gli enzimi attivi.

Carbonio estraibile totale (sostanza umica) Carbonio fulvico (AF) Carbonio umico (AU)

. Le sostanze umiche vengono considerate un “cross-point” tra le reazioni del mondo minerale e quelle del mondo organico. Infatti, oltre ad avere un ruolo essenziale nel determinare le caratteristiche chimico-fisiche dei fanghi, funzionano da riserva dei più importanti macro e micro-elementi e condizionano l'attività delle piante e l'equilibrio della microflora (Stevenson, 1982). Le sostanze umiche hanno, quindi, un ruolo fondamentale nell'espressione della “fertilità biochimica” e nella conservazione della qualità dei suoli (Del Bene et al, 1994). La funzione delle sostanze umiche è quella di stabilizzare gli enzimi liberi formando complessi umo-enzimatici che proteggono tali enzimi dall'attacco microbico e li rendono più resistenti agli stress chimico-fisici (Nannipieri et al., 1996). Il carbonio estraibile aumenta significativamente nel tempo ($p<0,01$), raggiungendo la concentrazione massima nei mesi estivi, dopodichè si ha una flessione alla fine della sperimentazione (Fig. 13). L'attività delle piante, associata a quella dei microrganismi il cui metabolismo è stimolato dalle aggiunte di fango, favorisce sia la fase di mineralizzazione che la fase di umificazione della sostanza organica

Sulle sostanze umiche estratte mediante pirofosfato alcalino è stato determinato il carbonio fulvico (Fig. 14) e umico (Fig. 15).

L'andamento del carbonio fulvico presenta un picco significativo ($p<0,01$) nel secondo campionamento, per poi stabilizzarsi nei mesi successivi. Il carbonio

umico invece mostra la massima concentrazione al terzo campionamento e valori finali decrescenti ma comunque più alti di quelli di partenza. Questi andamenti sono avvalorati dal fatto che l'umificazione della sostanza organica comincia dalla componente più labile della sostanza umica, cioè la componente fulvica (Albiach et al., 2000).

La diminuzione finale di questi parametri può essere dovuta non solo dal substrato prelevato ma anche dalla metodologia usata per l'estrazione, che può creare problemi quando si tratta di valutare l'umificazione dei residui organici come i fanghi prodotti dalla depurazione di acque reflue civili e industriali. Da questi materiali infatti, insieme agli acidi umici, si estraggono anche sostanze di natura lipidica, alterando così il significato e l'evoluzione tradizionale di questi marcatori (Ceccanti et al., 1996).

Risulta inoltre interessante la correlazione positiva tra i valori delle sostanze umiche e le attività enzimatiche extracellulari durante tutto il corso della sperimentazione.

| Carbonio estraibile totale($\mu\text{gC/g}_{ss}$) | | | | | | | | |
|---|-------|------------|--------|------------|--------|------------|-------|-----------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 85520 | ± 304 | 116857 | ± 1821 | 112028 | ± 2580 | 95071 | ± 455 |
| vasca 4 | 85734 | ± 3035 | 99686 | ± 2125 | 102262 | ± 2732 | 81227 | ± 607 |
| vasca 5 | 86056 | ± 2277 | 104301 | ± 3491 | 111169 | ± 2277 | 72319 | ± 455 |
| vasca 6 | 95500 | ± 4401 | 102905 | ± 3643 | 128877 | ± 2125 | 73178 | ± 759 |

Tabella 21 Valori del Carbonio estraibile totale durante la sperimentazione

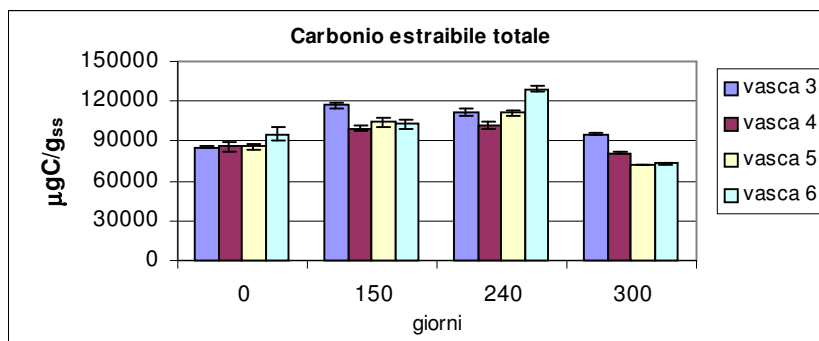


Figura 18 Andamento del Carbonio estraibile totale durante la sperimentazione

| Acidi fulvici($\mu\text{gC/g}_{ss}$) | | | | | | | | |
|--|-------|-------------|--------|------------|-------|-----------|-------|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | Dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 74358 | ± 17606 | 100866 | ± 8651 | 59119 | ± 607 | 57938 | ± 152 |
| vasca 4 | 67061 | ± 911 | 91530 | ± 3339 | 53860 | ± 759 | 47099 | ± 2428 |
| vasca 5 | 72319 | ± 2580 | 94320 | ± 2125 | 57187 | ± 1 | 52036 | ± 1214 |
| vasca 6 | 73178 | ± 2884 | 86378 | ± 607 | 60192 | ± 304 | 51606 | ± 911 |

Tabella 22 Valori degli acidi fulvici durante la sperimentazione

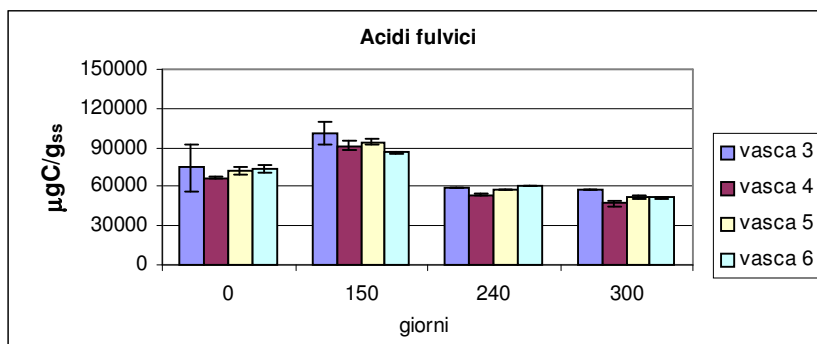


Figura 19 Andamento degli acidi fulvici durante la sperimentazione

| Acidi umici ($\mu\text{gC/g}_{ss}$) | | | | | | | | |
|---------------------------------------|-------|-------------|-------|------------|-------|-----------|-------|------------|
| | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 11161 | ± 17606 | 15991 | ± 8651 | 52909 | ± 607 | 37133 | ± 152 |
| vasca 4 | 18674 | ± 911 | 8156 | ± 3339 | 48401 | ± 759 | 34128 | ± 2428 |
| vasca 5 | 13737 | ± 2580 | 9981 | ± 2125 | 53982 | ± 1 | 20283 | ± 1214 |
| vasca 6 | 22323 | ± 2884 | 16527 | ± 607 | 68685 | ± 304 | 21571 | ± 911 |

Tabella 23 Valori degli acidi umici durante la sperimentazione

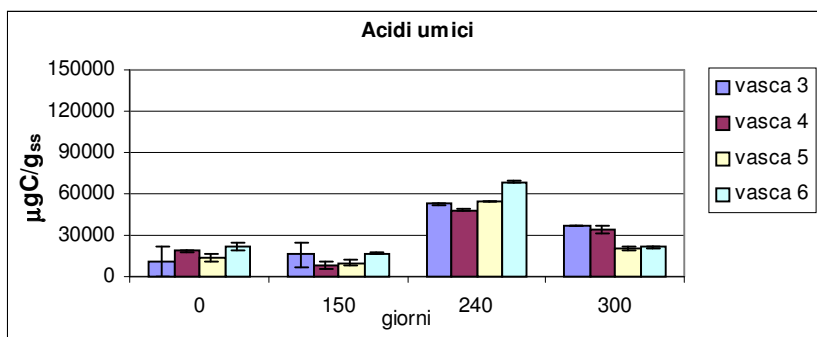


Figura 20 Andamento degli acidi umici durante la sperimentazione

Carbonio estraibile extracellulare

Il valore di questo parametro è molto importante perché comprende la sostanza umica con attività enzimatica. Per la determinazione della frazione di carbonio biochimicamente attiva cioè quella legata agli enzimi extracellulari viene utilizzata una soluzione di pirofosfato a pH neutro. A tale valore di pH, la capacità estraente del pirofosfato risulta più blanda e di conseguenza la quantità di carbonio estratta è minore però in questo modo, gli enzimi rimangono attivi.

L'andamento di questo parametro è decrescente in tutte le vasche fino ai mesi estivi, dopodiché tende ad aumentare fino a valori più bassi di quelli iniziali.

| Carbonio estraibile extracellulare ($\mu\text{g C/g}_{ss}$) | | | | | | | | |
|---|-------|------------|-------|-----------|------|------------|-------|-----------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 14350 | ± 76 | 9306 | ± 379 | 7336 | ± 911 | 6250 | ± 360 |
| vasca 4 | 13277 | ± 1442 | 5819 | ± 379 | 8933 | ± 664 | 5364 | ± 209 |
| vasca 5 | 13385 | ± 1062 | 6570 | ± 379 | 7457 | ± 57 | 6867 | ± 247 |
| vasca 6 | 13814 | ± 228 | 11211 | ± 266 | 8342 | ± 1271 | 10261 | ± 114 |

Tabella 24 Valori del carbonio estraibile extracellulare durante la sperimentazione.

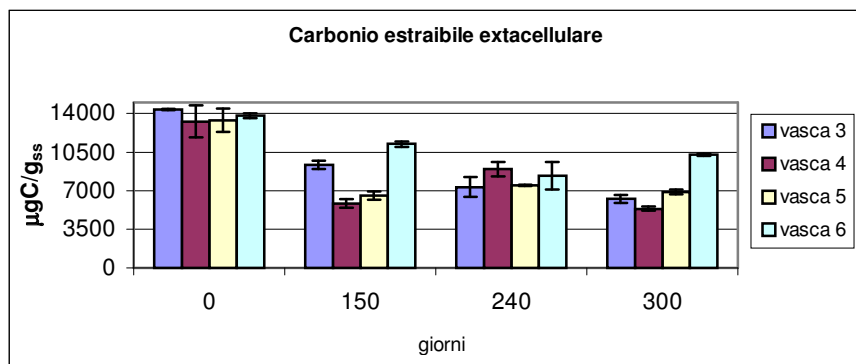


Figura 21 Andamento del carbonio extracellulare durante la sperimentazione.

Attività enzimatiche extracellulari

β -Glucosidasi e fosfatasi extracellulari

Le attività enzimatiche extracellulari, legate al ciclo del carbonio (β -Glucosidasi) e del fosforo (fosfatasi), tendono ad aumentare nei primi mesi, per poi tornare a diminuire. L'iniziale aumento delle attività può essere causata dalla presenza di substrati disponibili. La successiva riduzione dell'attività enzimatica, a livello extracellulare, può essere dovuta: all'aumento di carbonio umico, che può rendere non disponibili alcuni siti catalitici dell'enzima, alla diminuzione del substrato disponibile, oppure ad una elevata concentrazione di protoni che possono ionizzare i gruppi attivi dell'enzima. (Nannipieri et al., 1982). L'andamento delle attività extracellulari insieme a quello del carbonio umico ha un importante riscontro ecologico, in quanto indica la presenza di un tipo di sostanza organica, resistente alla degradazione, cui sono legate proteine enzimatiche attive. Il loro studio permette quindi di valutare la funzionalità biochimica delle sostanze umiche.

| B-glucosidasi extracellulare ($\mu\text{gPNG/g}_{ss} \cdot \text{h}$) | | | | | | | | |
|---|-------|-----------|-------|------------|-------|-----------|-------|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 101,9 | $\pm 4,7$ | 423,5 | $\pm 40,5$ | 95,9 | $\pm 3,0$ | 83,9 | $\pm 2,8$ |
| vasca 4 | 154,6 | $\pm 9,5$ | 210,2 | $\pm 4,8$ | 166,1 | $\pm 9,0$ | 127,9 | $\pm 11,3$ |
| vasca 5 | 162,9 | $\pm 4,6$ | 312,3 | $\pm 11,6$ | 69,3 | $\pm 0,5$ | 68,9 | $\pm 2,8$ |
| vasca 6 | 158,9 | $\pm 5,7$ | 387,5 | $\pm 4,9$ | 86,4 | $\pm 3,5$ | 104,4 | $\pm 6,4$ |

Tabella 25 Valori della β -glucosidasi extracellulare durante la sperimentazione

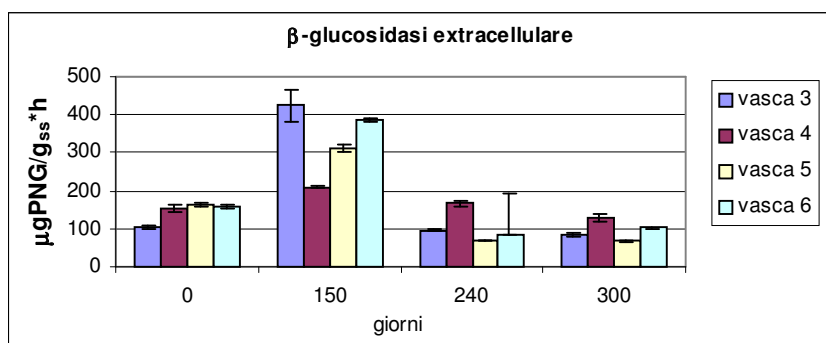


Figura 22 Andamento della β -glucosidasi extracellulare durante la sperimentazione

| Fosfatasi extracellulare ($\mu\text{gPNP/g}_{ss} \cdot \text{h}$) | | | | | | | | |
|---|-----|------------|------|------------|-----|------------|-----|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 309 | $\pm 19,4$ | 1244 | $\pm 21,2$ | 237 | $\pm 7,80$ | 147 | $\pm 32,5$ |
| vasca 4 | 356 | $\pm 41,3$ | 722 | $\pm 40,4$ | 469 | $\pm 13,8$ | 268 | $\pm 23,3$ |
| vasca 5 | 377 | $\pm 55,0$ | 724 | $\pm 49,2$ | 214 | $\pm 8,5$ | 157 | $\pm 22,6$ |
| vasca 6 | 449 | $\pm 39,0$ | 957 | $\pm 38,2$ | 238 | $\pm 26,3$ | 258 | $\pm 14,8$ |

Tabella 26 Valori della fosfatasi extracellulare durante la sperimentazione.

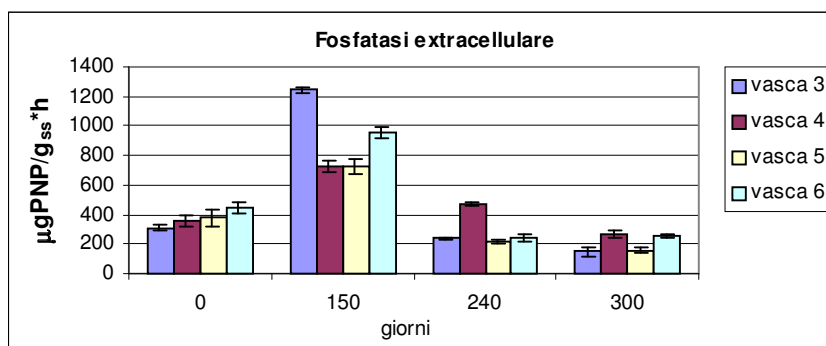


Figura 23 Andamento della fosfatasi extracellulare durante la sperimentazione.

Proteasi e ureasi extracellulare

Le attività enzimatiche ureasica e proteasica extracellulari, sono legate al ciclo dell'azoto. L'attività proteasica extracellulare tende ad aumentare nell'ultimo campionamento, anche se nel corso di tutta la sperimentazione ha un andamento discontinuo difficile da interpretare. I risultati dell'ultimo campionamento possono far ipotizzare la formazione di complessi umo-enzimatici stabili che proteggono l'enzima da eventuali inibitori presenti nel mezzo extracellulare, come proposto da uno studio sulle proteasi del terreno (Ceccanti et al., 1989).

L'attività ureasica è legata alle proprietà della sostanza organica in esame infatti tale enzima esiste soprattutto in forma extracellulare (McLaren, 1975): di solito è presente in forma stabilizzata dalle sostanze umiche a loro volta adsorbite sui costituenti inorganici del suolo. L'ureasi tende all'aumento nei primi 240 giorni della sperimentazione mentre al tempo finale si osserva una sua diminuzione o stabilizzazione. Questo potrebbe dipendere dalla progressiva formazione di sostanze inibitrici, così come dal fatto che è necessario più tempo perché l'enzima venga stabilizzato nella sostanza umica. E' interessante notare però che tale attività extracellulare, in tutte le vasche, presenta valori maggiori alla fine dell'esperimento rispetto a quelli di partenza, così come la concentrazione di acidi umici; ciò avvalorava l'ipotesi di tale enzima correlato alla sostanza umica.

| Proteasi extracellulare ($\mu\text{gBAA/g}_{\text{ss}} \cdot \text{h}$) | | | | | | | | |
|---|------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | Dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 74,0 | $\pm 4,90$ | 121 | $\pm 4,60$ | 3,52 | $\pm 1,52$ | 163 | $\pm 0,52$ |
| vasca 4 | 50,0 | $\pm 12,5$ | 75,5 | $\pm 1,44$ | 27,0 | $\pm 3,44$ | 224 | $\pm 1,89$ |
| vasca 5 | 86,1 | $\pm 2,50$ | 82,5 | $\pm 3,30$ | 28,2 | $\pm 9,93$ | 41,9 | $\pm 3,96$ |
| vasca 6 | 162 | $\pm 55,7$ | 172 | $\pm 3,70$ | 2,50 | $\pm 0,52$ | 179 | $\pm 3,75$ |

Tabella 27 Valori della proteasi extracellulare durante la sperimentazione.

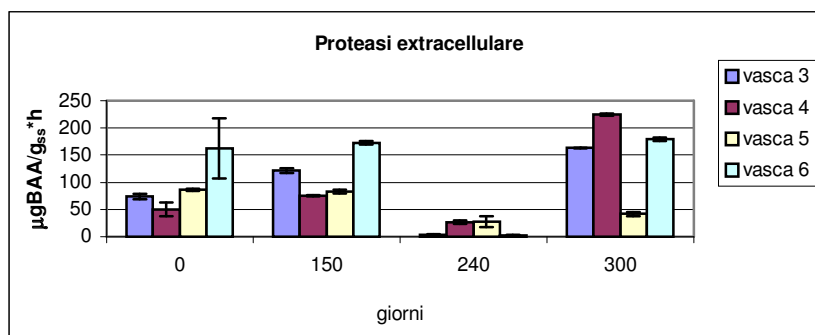


Figura 24 Andamento della proteasi extracellulare durante la sperimentazione.

| Ureasi extracellulare ($\mu\text{gNH}_3/\text{g}_{\text{ss}} \cdot \text{h}$) | | | | | | | | |
|---|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|
| giorni | 0 | dev.st | 150 | dev.st | 240 | dev.st. | 300 | dev.st. |
| vasca 3 | 191,5 | ± 18 | 280,6 | ± 12 | 328,9 | $\pm 13,2$ | 219,9 | ± 20 |
| vasca 4 | 36,0 | ± 39 | 205,0 | $\pm 39,9$ | 515,5 | $\pm 39,9$ | 287,0 | $\pm 39,9$ |
| vasca 5 | 64,7 | $\pm 55,8$ | 159,8 | ± 53 | 81,12 | ± 53 | 113,3 | $\pm 52,8$ |
| vasca 6 | 143,5 | $\pm 32,8$ | 120,3 | ± 33 | 191,8 | ± 32 | 259,0 | $\pm 31,8$ |

Tabella 28 Valori dell'ureasi extracellulare durante la sperimentazione.

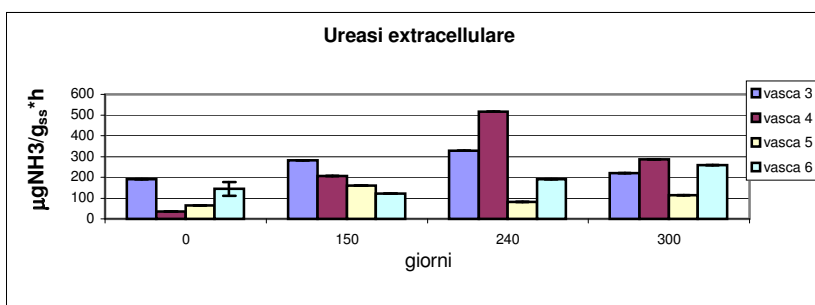


Figura 25 Andamento dell'ureasi extracellulare durante la sperimentazione.

Test di fito-tossicità

Il test di germinazione permette di evidenziare la presenza di sostanze tossiche, o che comunque possiedono un'azione di inibizione, per la germinazione del seme (Potenz et al., 1985a). Valori nulli o inferiori al 40% dell'indice di germinazione (I.G.) indicano tossicità elevate, letali per le piante; valori compresi tra 40% e 60% indicano una tossicità ancora capace di causare danni, ma difficilmente letale; valori superiori a 60%-70%, invece, non causano danni manifesti alle piante (Potenz et al., 1985b). Generalmente il test viene effettuato in assenza di terreno utilizzando semi di *Lepidium sativum*, che è una specie vegetale molto sensibile alle sostanze tossiche (Zucconi et al., 1981). I valori degli IG, rilevati per i quattro letti vegetati all'inizio e alla fine della sperimentazione, sono risultati sempre superiori a 40% e coerenti con i dati della letteratura, riguardanti la tolleranza vegetale ai fanghi provenienti da reflui civili..

| Test di germinazione (Ig%) | | | | |
|----------------------------|----|--------|-----|--------|
| giorni | 0 | dev.st | 300 | dev.st |
| vasca 3 | 73 | 0,7 | 190 | 1,2 |
| vasca 4 | 75 | 0,5 | 182 | 1,01 |
| vasca 5 | 68 | 0,6 | 160 | 1,03 |
| vasca 6 | 65 | 0,7 | 175 | 0,8 |

Tabella 29. Valori del test di germinazione al primo campionamento ed ultimo.

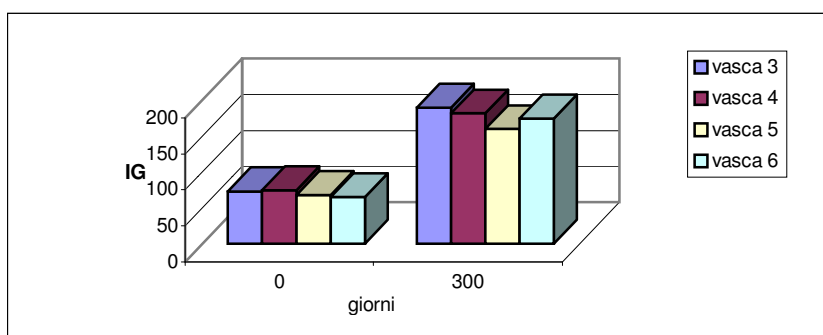


Tabella 30 Andamento del test di germinazione.

Riduzione dei fanghi

Il piano di lavoro prevedeva l'immissione di fango nei letti vegetati ogni 15 giorni. I volumi immessi erano circa 5 m^3 per vasca per un totale di 20 m^3 . Prima dello sversamento e dopo veniva effettuata la misurazione dell'altezza dei fanghi all'interno dei letti, al fine di monitorare il funzionamento dello strato di dreno ed i tempi di ispessimento e disidratazione dei fanghi giacenti. Dai dati raccolti abbiamo stimato che su 100 t di fanghi per vasca, immessi durante tutto il corso della sperimentazione, ne sono rimasti 12,5 t; la riduzione dei volumi di fango è stata quindi superiore all'80%. Considerato che l'umidità del fango è sempre stata compresa tra l'85-90%, l'azione evapo-traspiratrice delle *Phragmites Australis*, sommata alla conducibilità idraulica dei letti, ha portato alla disidratazione dei fanghi

| Frequenza immissioni fanghi | m3 fanghi sversati | riduzione in m3 in vasca 3 | riduzione in m3 in vasca 4 | riduzione in m3 in vasca 5 | riduzione in m3 in vasca 6 |
|------------------------------------|-----------------------------------|---|---|---|---|
| 17/11/2004 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 06/12/2004 | 5 | 2,50 | 2,50 | 3,00 | 3,00 |
| 19/12/2004 | 10 | 1,00 | 2,00 | 2,50 | nr |
| 14/01/2005 | 4 | 7,50 | 7,50 | 6,50 | 8,00 |
| 4/02/2005 | 3 | 2,20 | 2,20 | 3,00 | 4,00 |
| 4/03/2005 | 2 | 1,95 | 1,80 | 3,40 | 3,00 |
| 18/03/2005 | 4 | 0,50 | 0,50 | 1,50 | 1,50 |
| 25/03/2005 | 3 | 1,20 | 1,20 | 1,80 | 2,25 |
| 7/04/2005 | 3 | 1,65 | 1,80 | 1,35 | 1,65 |
| 22/04/2005 | 1 | 0,60 | 0,60 | 1,50 | 1,60 |
| 10/05/2005 | 3 | 0,65 | 0,65 | nr | nr |
| 17/05/2005 | 5 | 2,25 | 2,25 | nr | nr |
| 01/06/2005 | 3 | nr | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 07/06/2005 | 5 | 1 | 0,20 | 0,90 | 0,60 |
| 01/07/2005 | 5 | nr | nr | nr | nr |
| 18/07/2005 | 5 | 3,50 | 2,50 | 3,50 | 3,50 |
| 29/07/2005 | 4 | 5,00 | 6,00 | 5,25 | 6,25 |
| 10/08/2005 | 5 | 3,60 | 3,80 | 3,60 | 3,60 |
| 30/08/2005 | 5 | 5,25 | 5,50 | 5,25 | 4,50 |
| 15/09/2005 | 5 | 4,75 | 4,00 | 5,50 | 5,25 |
| 28/09/2005 | 5 | 5,50 | 5,25 | 4,75 | 4,50 |
| 10/10/2005 | 5 | 4,75 | 4,75 | 5,25 | 5,75 |
| 28/10/2005 | 5 | 3,75 | 3,50 | 3,75 | 4,00 |
| 15/11/2005 | 5 | 5,50 | 5,25 | 5,50 | 4,50 |
| 25/11/2005 | 5 | 3,75 | 6,25 | 3,50 | 5,75 |

Tabella 31 Misurazioni in campo dei quantitativi di fango immessi e di quelli rimasti nei letti.

Vantaggi economici del processo.

Durante tutto il periodo della sperimentazione (Dicembre 2004-Novembre 2005), il depuratore di La Rotta ha prodotto circa 1.064 t di fango di cui circa 664 t sono state trasportate tramite autocamion e smaltite in discarica. Le 400 t rimaste sono state immesse nei letti adiacenti l'impianto per un totale di circa 100 t (100 m^3) di fango per letto di cui, alla fine della sperimentazione, ne sono rimaste circa 12.5 t e portate in discarica. Questo vuol dire che all'interno di ogni vasca, grazie alla disidratazione e dilavamento ad opera del flusso percolante e all'azione di stabilizzazione ed evapotraspirazione delle piante, sono state eliminate circa 87.5 t di fango, per un totale di 350 t annuali.

Considerato che i costi di trasporto e smaltimento ammontano a circa 300€ per 25 m^3 di fango, con l'utilizzo dei letti di fitostabilizzazione si è verificato un risparmio di 4.200€ annui. L'analisi dei costi indica pertanto che il trattamento ha portato ad un notevole risparmio economico nella gestione dell'impianto di Pontedera.

I dati riguardanti le spese di gestione dei fanghi, risalenti al periodo precedente (2003-2004), raggiungevano circa i 12.800€; con la messa in opera dei letti vegetati il bilancio del periodo 2004-2005 si è concluso con un risparmio del 32.8% rispetto all'anno precedente, per una spesa totale di 8.500€.

Analisi statistica

L'analisi dei fanghi utilizzati nel corso della sperimentazione fornisce un set di dati articolato in cui ogni singola vasca viene ad essere caratterizzata da una molteplicità di parametri. Dall'analisi statistica sono state isolate le prime 2 componenti principali che spiegano la gran parte della varianza totale dell'insieme di dati (Tab.29). Queste contengono tutte le informazioni relative alle caratteristiche chimiche e metaboliche (attività enzimatiche) dei fanghi considerati.

La Fig.26 mostra la sovrapposizione del grafico dei *loadings* con quello degli *scores* al fine di correlare i vari parametri tra loro e nello spazio. Al tempo zero i trattamenti (vasche 3, 4, 5, 6) si posizionano vicini tra loro, correlati solo al pH e all'attività ureasica. Dopo 150 giorni i trattamenti 5 e 6 si trovano correlati con parte delle attività enzimatiche totali legate al ciclo del carbonio, deidrogenasi e β -glucosidasi, con il carbonio idrosolubile e fulvico, parametri che raggiungono nel secondo campionamento valori elevati, mentre è evidente come i trattamenti 3 e 4 si separino dagli altri. Nelle ultime fasi del processo (240 e 300 giorni) i trattamenti riprendono un andamento omogeneo con differenze trascurabili, a conferma di una probabile stabilizzazione. E' interessante notare il peso e la stretta correlazione che assumono qui i parametri legati al ciclo del fosforo (P totale e fosfatasi) e a quello dell'azoto (NH_3 , NO_2^- , NO_3^- , e ureasi). Inoltre la presenza degli acidi umici indica che il processo di fitostabilizzazione è in corso. I parametri disposti al centro del grafico, carbonio inorganico e proteasi, rappresentano situazioni intermedie, poco collegate sia ai tempi che alle vasche.

I risultati della suddetta analisi statistica concordano con i dati ottenuti dalla matrice di correlazione (Tab.30, 31, 32, 33, 34).

L'esame dei parametri considerati e la stretta relazione esistente tra essi, indica l'importanza delle attività enzimatiche totali, rispetto a quelle extracellulari, come indicatori della qualità e dell'andamento della stabilizzazione dei fanghi in letti vegetati. Inoltre è stato importante il monitoraggio di N e P che, oltre ad essere i principali elementi le cui concentrazioni devono essere abbattute con la depurazione ed i nutrienti essenziali per le *Phragmites*,, possono indicare la

presenza di processi di anaerobiosi, di accumulo o di rimozione (PO_4^{3-} , NO_3^-) ad opera delle piante.

| | Fattore | Fattore |
|---------------------|---------|---------|
| | 1 | 2 |
| pH | 0,28 | -0,87 |
| CE | -0,80 | 0,55 |
| C estraibile totale | -0,04 | 0,71 |
| Acidi umici | -0,85 | 0,24 |
| Acidi fulvici | 0,88 | 0,35 |
| C idrosolubile | 0,77 | 0,54 |
| C extracellulare | 0,89 | -0,25 |
| C inorganico | 0,02 | -0,52 |
| C organico | 0,89 | 0,28 |
| C totale | 0,82 | 0,27 |
| Proteasi totale | -0,57 | -0,11 |
| Proteasi | 0,42 | 0,11 |
| Bglucosidasi totale | 0,89 | 0,08 |
| Bglucosidasi | 0,75 | 0,57 |
| Ureasi totale | 0,39 | -0,76 |
| Ureasi | -0,35 | 0,37 |
| Fosfatasi | 0,76 | 0,55 |
| Fosfatasi totale | -0,37 | 0,65 |
| NH ₃ | -0,38 | 0,43 |
| N totale | 0,88 | -0,15 |
| P totale | -0,85 | -0,15 |
| Dhase | 0,90 | 0,25 |
| C. frazione | 0,38 | -0,78 |
| Cloruri | -0,77 | 0,57 |
| Nitriti | -0,41 | 0,03 |
| Nitrati | -0,36 | -0,06 |
| Fosfati | 0,31 | 0,66 |
| Solfati | -0,73 | -0,06 |
| Var. Sp. | 12,02 | 5,99 |
| Prp.Tot. | 0,43 | 0,21 |

Tabella 32 Tabella dei loadings

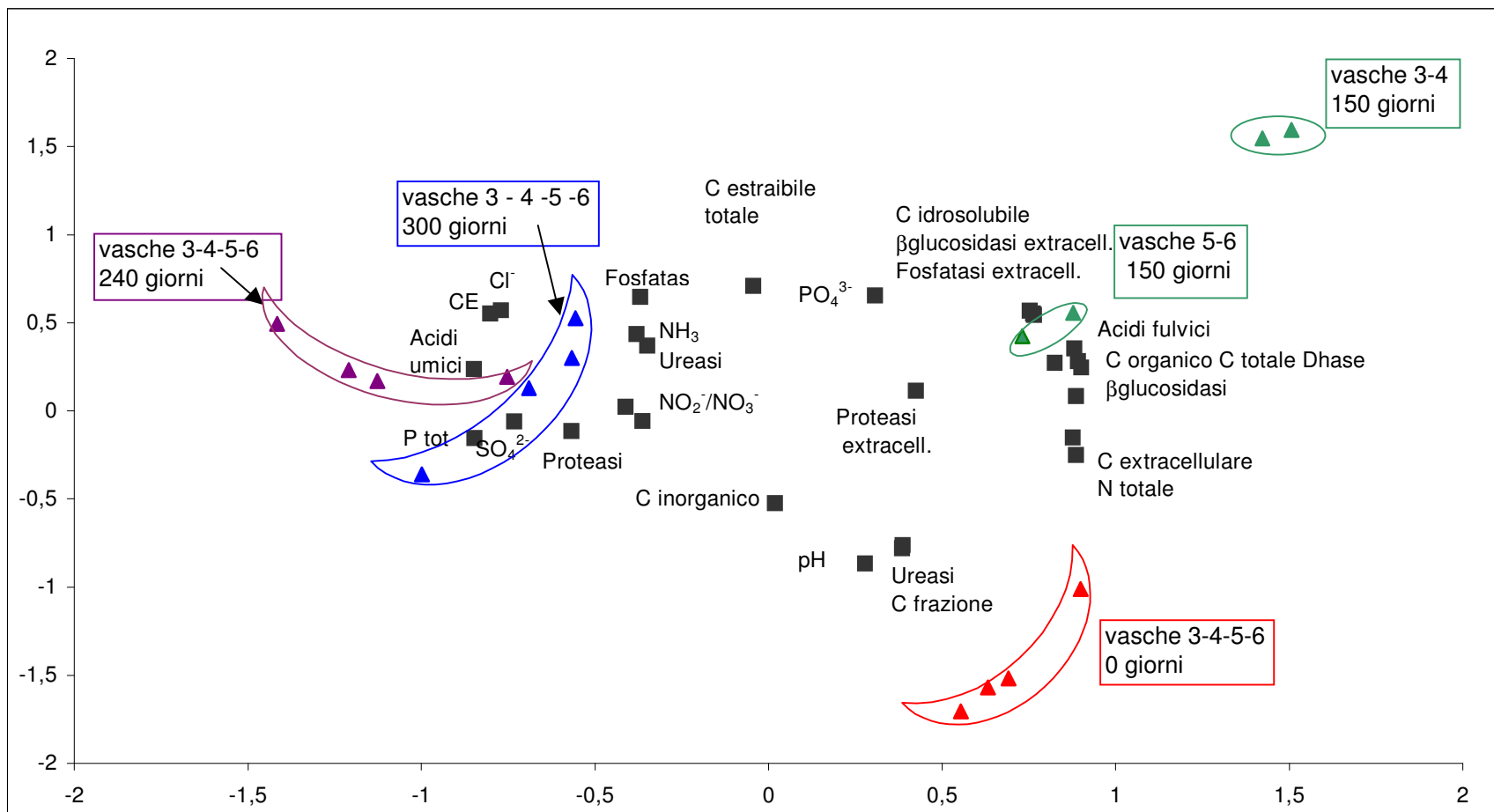


Figura 26 Analisi delle componenti principali.

Correlazione tra le attività enzimatiche

Fosfatasi, β -glucosidasi, proteasi, ureasi sono quattro enzimi fondamentali nei cicli del fosforo, carbonio e azoto rispettivamente, mentre la deidrogenasi è un indice dell'attività microbica totale presente nei fanghi.

L'attività deidrogenasica è strettamente correlata con le attività β -glucosidasi e fosfatasi, con il carbonio organico, idrosolubile e con la sostanza umica ($r > 0,80$) (Tab.34); le attività ureasica e proteasica non sono correlate con le altre attività enzimatiche, ma per la prima, si evidenzia una stretta relazione con la frazione del carbonio estraibile, mentre per la seconda c'è una correlazione negativa con l'azoto organico.

I risultati indicano che queste attività non sono legate a quelle extracellulari e che gli enzimi legati al ciclo del fosforo e del carbonio (fosfatasi, β -glucosidasi) possono essere considerati biomarcatori per lo stato di evoluzione della materia organica. Come descritto precedentemente, l'attività iniziale di questi due enzimi e della deidrogenasi decresce gradualmente nel corso della sperimentazione; questo indica che sono enzimi inducibili ovvero che più è elevata la disponibilità di substrato più alta sarà l'attività enzimatica (Burns, 1982; Nannipieri et al., 1990).

Gli enzimi extracellulari rappresentano un mezzo biochimico per seguire l'evoluzione del processo di degradazione/sintesi delle molecole organiche, a causa del loro legame con le sostanze umiche.

Sempre dalla Tabella 34 emerge che ureasi e proteasi extracellulari non sono correlabili alle altre attività (totali ed extracellulari) né all'azoto, tranne che per l'ureasi, correlata negativamente all'azoto ammoniacale; questo fa supporre che la presenza degli enzimi extracellulari è ancora legata all'attività microbica e che, quindi, serve più tempo perché essi si stabilizzino all'interno della sostanza umica. Al contrario le attività β -glucosidasi e fosfatasi sono strettamente correlate fra loro, ed anche con il carbonio totale e fulvico; ciò dimostra come tali enzimi abbiano rilevanza nel metabolismo delle sostanze umiche. Inoltre l'andamento di queste attività enzimatiche extracellulari tende alla diminuzione nel tempo in tutte le vasche, probabilmente perché nel periodo della sperimentazione (9 mesi) il

processo di mineralizzazione-umificazione della sostanza organica è ancora in corso.

| vasca 3 | pH | CE | C estr. tot. | Ac. umici | Ac. fulvici | C idro. | C extracell. | C inorg. | C org. | C tot. | Proteasi tot. | Proteasi | β-gluc tot. | β-gluc. | Ureasi tot. | Ureasi | Fosfatasi | Fosf. tot. | NH3 | N totale | P tot. | Dhase | C.fraz. | nitrati | fosfati | solfati |
|--------------------|-------|-------|--------------|-----------|-------------|---------|--------------|----------|--------|--------|---------------|----------|-------------|---------|-------------|--------|-----------|------------|-------|----------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| pH | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CE | -0,53 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C estraibile tot. | -0,94 | 0,43 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi umici | -0,27 | 0,86 | 0,33 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi fulvici | -0,43 | -0,52 | 0,41 | -0,72 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C idrosolubile | -0,63 | -0,26 | 0,55 | -0,57 | 0,96 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C extracellulare | 0,24 | -0,73 | -0,39 | -0,97 | 0,65 | 0,55 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C organico | -0,45 | -0,44 | 0,37 | -0,74 | 0,98 | 0,98 | 0,72 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi totale | 0,46 | 0,04 | -0,19 | 0,54 | -0,66 | -0,78 | -0,68 | -0,79 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi | -0,12 | 0,08 | -0,22 | -0,40 | 0,23 | 0,37 | 0,62 | 0,42 | -0,86 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| β-glucosidasi tot. | -0,37 | -0,59 | 0,43 | -0,69 | 0,98 | 0,89 | 0,56 | 0,91 | -0,48 | 0,02 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| β-glucosidasi | -0,71 | -0,20 | 0,65 | -0,48 | 0,94 | 0,99 | 0,44 | 0,94 | -0,72 | 0,27 | 0,89 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi totale | 0,67 | -0,87 | -0,44 | -0,50 | 0,16 | -0,13 | 0,30 | 0,02 | 0,46 | -0,52 | 0,32 | -0,15 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi | -0,73 | 0,53 | 0,89 | 0,64 | 0,03 | 0,14 | -0,73 | -0,05 | 0,26 | -0,56 | 0,12 | 0,27 | -0,30 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi | -0,66 | -0,27 | 0,63 | -0,52 | 0,96 | 0,99 | 0,47 | 0,95 | -0,68 | 0,22 | 0,92 | 1,00 | -0,07 | 0,26 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi totale | -0,85 | 0,53 | 0,96 | 0,55 | 0,16 | 0,30 | -0,63 | 0,10 | 0,08 | -0,42 | 0,22 | 0,42 | -0,40 | 0,98 | 0,40 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| NH3 | -0,32 | 0,79 | 0,04 | 0,42 | -0,38 | -0,12 | -0,18 | -0,20 | -0,40 | 0,66 | -0,56 | -0,14 | -0,92 | -0,05 | -0,22 | 0,02 | 1,00 | | | | | | | | | |
| N totale | -0,08 | -0,74 | 0,03 | -0,93 | 0,93 | 0,82 | 0,88 | 0,92 | -0,65 | 0,35 | 0,89 | 0,76 | 0,35 | -0,33 | 0,79 | -0,22 | -0,42 | 1,00 | | | | | | | | |
| P totale | 0,12 | 0,70 | -0,06 | 0,92 | -0,94 | -0,85 | -0,88 | -0,94 | 0,69 | -0,39 | -0,89 | -0,78 | -0,29 | 0,32 | -0,81 | 0,20 | 0,38 | -1,00 | 1,00 | | | | | | | |
| Dhase | -0,35 | -0,55 | 0,29 | -0,80 | 0,99 | 0,95 | 0,76 | 0,99 | -0,74 | 0,37 | 0,93 | 0,91 | 0,14 | -0,12 | 0,93 | 0,02 | -0,30 | 0,96 | -0,97 | 1,00 | 0,40 | | | | | |
| C. frazione | 0,65 | -0,99 | -0,52 | -0,78 | 0,37 | 0,10 | 0,63 | 0,28 | 0,11 | -0,18 | 0,47 | 0,04 | 0,93 | -0,54 | 0,11 | -0,58 | -0,81 | 0,62 | -0,57 | 0,40 | 1,00 | | | | | |
| Cloruri | -0,47 | 0,99 | 0,34 | 0,83 | -0,56 | -0,30 | -0,68 | -0,47 | 0,02 | 0,16 | -0,65 | -0,25 | -0,88 | 0,43 | -0,33 | 0,44 | 0,84 | -0,75 | 0,71 | -0,57 | -0,98 | 1,00 | | | | |
| nitriti | 0,87 | -0,87 | -0,77 | -0,62 | 0,04 | -0,23 | 0,52 | -0,02 | 0,27 | -0,16 | 0,13 | -0,30 | 0,90 | -0,69 | -0,23 | -0,76 | -0,66 | 0,36 | -0,31 | 0,09 | 0,94 | -0,84 | 1,00 | | | |
| nitrati | -0,13 | 0,13 | -0,21 | -0,36 | 0,19 | 0,34 | 0,58 | 0,38 | -0,85 | 1,00 | -0,02 | 0,24 | -0,55 | -0,55 | 0,19 | -0,40 | 0,69 | 0,31 | -0,35 | 0,34 | -0,22 | 0,20 | -0,19 | 1,00 | | |
| fosfati | -0,84 | 0,16 | 0,68 | -0,25 | 0,75 | 0,91 | 0,32 | 0,82 | -0,84 | 0,51 | 0,63 | 0,91 | -0,54 | 0,28 | 0,87 | 0,45 | 0,28 | 0,54 | -0,58 | 0,74 | -0,32 | 0,12 | -0,59 | 0,50 | 1,00 | - |
| solfati | 0,21 | 0,09 | 0,09 | 0,57 | -0,49 | -0,59 | -0,75 | -0,65 | 0,96 | -0,96 | -0,29 | -0,50 | 0,41 | 0,51 | -0,47 | 0,34 | -0,48 | -0,58 | 0,62 | -0,61 | 0,04 | 0,03 | 0,12 | -0,95 | -0,66 | 1,00 |

Tabella 33 Matrice di correlazione della vasca 3.

| vasca 4 | pH | CE | C estr. tot. | Ac. umici | Ac. fulvici | C idro. | C extracell. | C inorg. | C org. | C tot. | Proteasi tot. | Proteasi | β-gluc tot. | β-gluc. | Ureasi tot. | Ureasi | Fosfata si | Fosf.to t | NH3 | N totale | P tot | Dhase | C.fraz. | nitrati | fosfati | solati |
|-------------------|-------|-------|--------------|-----------|-------------|---------|--------------|----------|--------|--------|---------------|----------|-------------|---------|-------------|--------|---------------|--------------|------|----------|-------|-------|---------|---------|---------|--------|
| pH | 1,00 | -0,73 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CE | -0,73 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C estraibile tot. | -0,80 | 0,27 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi umici | -0,24 | 0,81 | -0,11 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi fulvici | -0,32 | -0,42 | 0,70 | -0,79 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C idrosolubile | -0,51 | -0,21 | 0,84 | -0,64 | 0,97 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C extracellulare | 0,17 | -0,75 | 0,14 | -1,00 | 0,81 | 0,66 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C organico | -0,23 | -0,50 | 0,63 | -0,84 | 1,00 | 0,95 | 0,85 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi totale | -0,02 | 0,51 | -0,05 | 0,88 | -0,67 | -0,55 | -0,92 | -0,68 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi | -0,60 | 0,35 | 0,24 | -0,21 | 0,30 | 0,35 | 0,31 | 0,24 | -0,63 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bglucosidasi tot. | 0,23 | -0,78 | 0,37 | -0,77 | 0,78 | 0,68 | 0,72 | 0,83 | -0,39 | -0,32 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bglucosidasi | -0,40 | -0,29 | 0,84 | -0,59 | 0,94 | 0,96 | 0,59 | 0,93 | -0,38 | 0,09 | 0,80 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi totale | 0,91 | -0,83 | -0,49 | -0,35 | -0,05 | -0,23 | 0,26 | 0,04 | 0,04 | -0,78 | 0,56 | -0,04 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi | -0,59 | 0,71 | 0,55 | 0,73 | -0,19 | 0,02 | -0,73 | -0,25 | 0,79 | -0,25 | -0,23 | 0,12 | -0,40 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi | -0,42 | -0,25 | 0,86 | -0,54 | 0,92 | 0,95 | 0,54 | 0,90 | -0,32 | 0,06 | 0,78 | 1,00 | -0,05 | 0,19 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi totale | -0,60 | 0,52 | 0,73 | 0,49 | 0,09 | 0,28 | -0,50 | 0,04 | 0,64 | -0,28 | 0,05 | 0,40 | -0,31 | 0,95 | 0,46 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| NH3 | -0,76 | 0,71 | 0,27 | 0,21 | 0,01 | 0,14 | -0,11 | -0,07 | -0,24 | 0,91 | -0,62 | -0,10 | -0,95 | 0,11 | -0,10 | 0,00 | 1,00 | | | | | | | | | |
| N totale | 0,14 | -0,77 | 0,39 | -0,89 | 0,88 | 0,78 | 0,86 | 0,92 | -0,60 | -0,08 | 0,97 | 0,83 | 0,42 | -0,37 | 0,80 | -0,08 | -0,42 | 1,00 | | | | | | | | |
| P totale | 0,15 | 0,55 | -0,49 | 0,92 | -0,96 | -0,89 | -0,93 | -0,97 | 0,84 | -0,37 | -0,76 | -0,82 | -0,04 | 0,45 | -0,78 | 0,18 | -0,01 | -0,90 | 1,00 | | | | | | | |
| Dhase | -0,21 | -0,50 | 0,68 | -0,78 | 0,98 | 0,95 | 0,78 | 0,99 | -0,57 | 0,12 | 0,88 | 0,96 | 0,10 | -0,15 | 0,94 | 0,15 | -0,16 | 0,94 | 0,93 | 1,00 | | | | | | |
| C. frazione | 0,97 | -0,72 | -0,67 | -0,18 | -0,28 | -0,46 | 0,10 | -0,19 | 0,13 | -0,77 | 0,34 | -0,28 | 0,97 | -0,41 | -0,30 | -0,39 | -0,89 | 0,20 | 0,17 | -0,14 | 1,00 | | | | | |
| Cloruri | -0,68 | 1,00 | 0,20 | 0,83 | -0,48 | -0,28 | -0,77 | -0,56 | 0,51 | 0,35 | -0,83 | -0,37 | -0,81 | 0,67 | -0,33 | 0,46 | 0,71 | -0,82 | 0,60 | -0,57 | -0,69 | 1,00 | | | | |
| nitriti | 0,78 | -0,99 | -0,39 | -0,79 | 0,33 | 0,11 | 0,73 | 0,42 | -0,53 | -0,31 | 0,69 | 0,18 | 0,83 | -0,78 | 0,13 | -0,63 | -0,67 | 0,69 | 0,50 | 0,40 | 0,75 | -0,98 | 1,00 | | | |
| nitrati | 0,42 | -0,89 | -0,06 | -0,98 | 0,68 | 0,49 | 0,97 | 0,74 | -0,83 | 0,10 | 0,75 | 0,47 | 0,49 | -0,80 | 0,41 | -0,59 | -0,33 | 0,85 | 0,83 | 0,69 | 0,35 | -0,90 | 0,88 | 1,00 | | |
| fosfati | -0,75 | 0,55 | 0,36 | -0,02 | 0,23 | 0,33 | 0,12 | 0,16 | -0,44 | 0,97 | -0,42 | 0,08 | -0,91 | -0,02 | 0,07 | -0,06 | 0,97 | -0,20 | 0,25 | 0,05 | -0,89 | 0,54 | -0,52 | #### | 1,00 | |
| solati | 0,27 | 0,44 | -0,55 | 0,87 | -0,96 | -0,91 | -0,90 | -0,96 | 0,84 | -0,48 | -0,68 | -0,82 | 0,10 | 0,39 | -0,78 | 0,14 | -0,14 | -0,84 | 0,99 | -0,91 | 0,30 | 0,49 | -0,38 | #### | -0,37 | 1,00 |

Tabella 34 Matrice di correlazione della vasca 4.

| vasca 5 | pH | CE | C estr. tot. | Ac. umici | Ac. fulvici | C idro. | C extracell. | C inorg. | C org. | C tot. | Proteasi tot. | Proteasi | β-gluc tot. | β-gluc. | Ureasi tot. | Ureasi | Fosfatasi | Fosf.tot. | NH3 | N totale | P tot. | Dhase | C.fraz. | nitrati | fosfati | solfati |
|-------------------|-------|-------|--------------|-----------|-------------|---------|--------------|----------|--------|--------|---------------|----------|-------------|---------|-------------|--------|-----------|-----------|-------|----------|--------|-------|---------|---------|---------|---------|
| pH | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CE | -0,84 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C estraibile tot. | -0,74 | 0,65 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi umici | -0,47 | 0,86 | 0,54 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi fulvici | 0,09 | -0,61 | -0,02 | -0,85 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C idrosolubile | -0,13 | -0,43 | 0,04 | -0,79 | 0,96 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C extracellulare | 0,66 | -0,81 | -0,91 | -0,84 | 0,42 | 0,37 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C organico | 0,31 | -0,62 | -0,73 | -0,86 | 0,57 | 0,61 | 0,92 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi totale | -0,37 | 0,68 | -0,11 | 0,62 | -0,81 | -0,64 | -0,20 | -0,14 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi | 0,41 | -0,81 | -0,57 | -0,99 | 0,82 | 0,79 | 0,86 | 0,91 | -0,54 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bglucosidasi tot. | 0,25 | -0,68 | 0,07 | -0,75 | 0,94 | 0,82 | 0,30 | 0,33 | -0,97 | 0,69 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bglucosidasi | -0,22 | -0,32 | 0,31 | -0,63 | 0,94 | 0,95 | 0,11 | 0,34 | -0,74 | 0,60 | 0,87 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi totale | 0,99 | -0,86 | -0,67 | -0,48 | 0,15 | -0,09 | 0,62 | 0,27 | -0,45 | 0,41 | 0,33 | -0,15 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi | 0,03 | 0,23 | 0,59 | 0,59 | -0,33 | -0,48 | -0,72 | -0,91 | -0,22 | -0,68 | -0,01 | -0,19 | 0,10 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi | -0,09 | -0,43 | 0,23 | -0,69 | 0,97 | 0,95 | 0,19 | 0,37 | -0,82 | 0,66 | 0,93 | 0,99 | -0,02 | -0,18 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi totale | -0,78 | 0,66 | 1,00 | 0,51 | 0,02 | 0,09 | -0,89 | -0,68 | -0,10 | -0,54 | 0,07 | 0,35 | -0,71 | 0,53 | 0,26 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| NH3 | -0,69 | 0,71 | 0,06 | 0,37 | -0,40 | -0,15 | -0,16 | 0,10 | 0,84 | -0,26 | -0,69 | -0,27 | -0,76 | -0,51 | -0,38 | 0,11 | 1,00 | | | | | | | | | |
| N totale | 0,74 | -0,98 | -0,70 | -0,94 | 0,68 | 0,54 | 0,89 | 0,77 | -0,62 | 0,91 | 0,67 | 0,39 | 0,75 | -0,43 | 0,49 | -0,69 | -0,56 | 1,00 | | | | | | | | |
| P totale | -0,24 | 0,73 | 0,27 | 0,95 | -0,97 | -0,93 | -0,64 | -0,75 | 0,73 | -0,94 | -0,87 | -0,83 | -0,27 | 0,50 | -0,88 | 0,23 | 0,36 | -0,81 | 1,00 | | | | | | | |
| Dhase | -0,02 | -0,52 | -0,08 | -0,86 | 0,97 | 0,99 | 0,48 | 0,69 | -0,65 | 0,86 | 0,83 | 0,92 | 0,02 | -0,53 | 0,93 | -0,03 | -0,18 | 0,64 | -0,97 | 1,00 | | | | | | |
| C. frazione | 0,99 | -0,78 | -0,75 | -0,38 | -0,02 | -0,23 | 0,63 | 0,27 | -0,27 | 0,33 | 0,15 | -0,33 | 0,98 | 0,05 | -0,20 | -0,79 | -0,64 | 0,68 | -0,14 | -0,12 | 1,00 | | | | | |
| Cloruri | -0,89 | 0,99 | 0,72 | 0,82 | -0,52 | -0,33 | -0,83 | -0,61 | 0,61 | -0,77 | -0,59 | -0,21 | -0,90 | 0,23 | -0,33 | 0,73 | 0,69 | -0,96 | 0,66 | -0,44 | -0,84 | 1,00 | | | | |
| nitriti | -0,12 | 0,42 | 0,66 | 0,74 | -0,46 | -0,56 | -0,83 | -0,97 | -0,05 | -0,81 | -0,17 | -0,28 | -0,07 | 0,98 | -0,29 | 0,61 | -0,32 | -0,60 | 0,64 | -0,62 | -0,09 | 0,42 | 1,00 | | | |
| nitrati | -0,30 | 0,60 | 0,73 | 0,85 | -0,56 | -0,60 | -0,91 | -1,00 | 0,12 | -0,90 | -0,32 | -0,33 | -0,26 | 0,92 | -0,36 | 0,68 | -0,12 | -0,76 | 0,74 | -0,68 | -0,26 | 0,60 | 0,98 | 1,00 | | |
| fosfati | -0,65 | 0,33 | 0,01 | -0,18 | 0,22 | 0,47 | 0,14 | 0,50 | 0,38 | 0,28 | -0,13 | 0,31 | -0,69 | -0,78 | 0,22 | 0,08 | 0,80 | -0,12 | -0,25 | 0,43 | -0,66 | 0,37 | -0,67 | -0,52 | 1,00 | |
| solfati | -0,24 | 0,53 | 0,73 | 0,80 | -0,49 | -0,56 | -0,89 | -0,99 | 0,03 | -0,86 | -0,23 | -0,28 | -0,20 | 0,95 | -0,30 | 0,68 | -0,21 | -0,69 | 0,68 | -0,63 | -0,21 | 0,53 | 0,99 | 1,00 | -0,58 | 1,00 |

Tabella 35 Matrice di correlazione della vasca 5.

[illegible]

Tabella 36 Matrice di correlazione della vasca 6

Vasche
3, 4, 5, 6

| | pH | CE | C estr. tot. | Ac. umici | Ac. fulvici | C idro. | C extracell. | C inorg. | C org. | C tot. | Proteasi tot. | Proteasi | β-gluc tot | β-gluc. | Ureasi tot | Ureasi | Fosfatasi | Fosf.tot | NH3 | N totale | P tot | Dhase | C.fraz. | nitrati | fosfati | solfati |
|------------------|-------|-------|--------------|-----------|-------------|---------|--------------|----------|--------|--------|---------------|----------|------------|---------|------------|--------|-----------|----------|-------|----------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|
| pH | 1,00 | -0,71 | -0,52 | -0,32 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CE | -0,71 | 1,00 | 0,29 | 0,75 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C estraibile tot | -0,52 | 0,29 | 1,00 | 0,49 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi umici | -0,32 | 0,75 | 0,49 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acidi fulvici | -0,10 | -0,56 | 0,33 | -0,66 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C idrosolubile | -0,33 | -0,34 | 0,34 | -0,57 | 0,92 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C extracell | 0,46 | -0,79 | -0,34 | -0,84 | 0,61 | 0,50 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C organico | 0,09 | -0,55 | 0,21 | -0,60 | 0,82 | 0,77 | 0,76 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi tot | -0,29 | 0,41 | -0,25 | 0,30 | -0,54 | -0,32 | -0,46 | -0,59 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteasi | -0,05 | -0,15 | -0,40 | -0,57 | 0,27 | 0,39 | 0,55 | 0,34 | -0,23 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| β-gluc tot | 0,21 | -0,74 | 0,25 | -0,61 | 0,87 | 0,74 | 0,62 | 0,80 | -0,57 | 0,11 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| β-glucosidasi | -0,33 | -0,32 | 0,39 | -0,52 | 0,90 | 0,97 | 0,44 | 0,77 | -0,36 | 0,33 | 0,81 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi totale | 0,76 | -0,82 | -0,34 | -0,41 | 0,15 | -0,05 | 0,39 | 0,14 | -0,01 | -0,29 | 0,45 | -0,03 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Ureasi | -0,29 | 0,49 | 0,29 | 0,42 | -0,21 | -0,14 | -0,47 | -0,15 | 0,17 | -0,25 | -0,16 | 0,00 | -0,30 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi | -0,30 | -0,34 | 0,41 | -0,51 | 0,90 | 0,94 | 0,46 | 0,81 | -0,37 | 0,29 | 0,81 | 0,99 | 0,01 | 0,07 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| Fosfatasi tot | -0,67 | 0,52 | 0,82 | 0,63 | 0,03 | 0,18 | -0,64 | -0,20 | 0,19 | -0,43 | -0,04 | 0,24 | -0,36 | 0,44 | 0,23 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| NH3 | -0,60 | 0,67 | -0,14 | 0,16 | -0,28 | 0,00 | -0,26 | -0,27 | 0,35 | 0,49 | -0,61 | -0,09 | -0,75 | -0,01 | -0,14 | 0,09 | 1,00 | | | | | | | | | |
| N totale | 0,50 | -0,79 | 0,00 | -0,65 | 0,70 | 0,46 | 0,83 | 0,82 | -0,71 | 0,24 | 0,81 | 0,50 | 0,43 | -0,23 | 0,56 | -0,40 | -0,57 | 1,00 | | | | | | | | |
| P totale | 0,05 | 0,60 | 0,01 | 0,79 | -0,84 | -0,82 | -0,72 | -0,68 | 0,37 | -0,46 | -0,74 | -0,79 | -0,24 | 0,37 | -0,78 | 0,13 | 0,16 | -0,61 | 1,00 | | | | | | | |
| Dhase | -0,06 | -0,61 | 0,15 | -0,75 | 0,94 | 0,90 | 0,69 | 0,78 | -0,43 | 0,37 | 0,87 | 0,88 | 0,19 | -0,29 | 0,85 | -0,07 | -0,25 | 0,68 | -0,89 | 1,00 | | | | | | |
| C. frazione | 0,76 | -0,79 | -0,49 | -0,44 | 0,06 | -0,09 | 0,51 | 0,12 | -0,01 | 0,07 | 0,34 | -0,07 | 0,86 | -0,34 | -0,03 | -0,47 | -0,53 | 0,46 | -0,26 | 0,14 | 1,00 | | | | | |
| Cloruri | -0,66 | 0,96 | 0,43 | 0,81 | -0,51 | -0,32 | -0,77 | -0,50 | 0,28 | -0,26 | -0,68 | -0,32 | -0,80 | 0,45 | -0,35 | 0,58 | 0,56 | -0,74 | 0,62 | -0,56 | -0,83 | 1,00 | | | | |
| nitriti | -0,33 | 0,32 | -0,07 | 0,21 | -0,30 | -0,17 | -0,40 | -0,54 | 0,40 | 0,12 | -0,38 | -0,15 | -0,14 | -0,03 | -0,15 | 0,34 | 0,44 | -0,47 | 0,00 | -0,29 | 0,06 | 0,15 | 1,00 | | | |
| nitrati | -0,26 | 0,32 | -0,38 | 0,02 | -0,34 | -0,24 | -0,31 | -0,51 | 0,43 | 0,27 | -0,42 | -0,19 | -0,17 | 0,08 | -0,19 | 0,03 | 0,50 | -0,42 | 0,03 | -0,30 | 0,06 | 0,07 | 0,88 | 1,00 | | |
| fosfati | -0,39 | 0,20 | 0,34 | -0,12 | 0,42 | 0,45 | 0,22 | 0,55 | -0,47 | 0,25 | 0,17 | 0,43 | -0,54 | 0,13 | 0,44 | 0,03 | 0,22 | 0,26 | -0,26 | 0,31 | -0,53 | 0,25 | -0,41 | 0 | 1,00 | |
| solfati | -0,10 | 0,44 | 0,35 | 0,81 | -0,58 | -0,61 | -0,76 | -0,67 | 0,22 | -0,68 | -0,43 | -0,53 | -0,03 | 0,31 | -0,50 | 0,57 | -0,17 | -0,50 | 0,56 | -0,65 | -0,12 | 0,48 | 0,40 | 0,17 | -0,36 | 1,00 |

Tabella 37 Matrice di correlazione tra i parametri delle vasche 3, 4, 5, e 6

Conclusioni

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi permettono di trarre le seguenti conclusioni:

- L'uso di letti vegetati adiacenti un depuratore tradizionale di reflui civili ha reso fattibile il processo di fitomineralizzazione dei fanghi biologici in uscita dall'impianto.
- I parametri chimico-fisici e biologici hanno permesso di valutare l'efficacia del processo di stabilizzazione; in particolare l'andamento delle attività enzimatiche, legate ai cicli di C, N, P ed alla biomassa microbica, è stato uno strumento utile per il monitoraggio dell'evoluzione della sostanza organica all'interno dei letti.
- L'evapotraspirazione ad opera delle *Phragmites australis* ha portato ad una notevole riduzione dei volumi di fanghi immessi nei letti. Inoltre la vegetazione ha aumentato la superficie utile per lo sviluppo delle colonie microbiche; ha funzionato da filtro, assimilato nutrienti, apportato ossigeno e contribuito alla conduttività idraulica del letto. La simultanea presenza di aree aerobiche e anaerobiche rispettivamente nella rizosfera e nelle aree ove non vi è stata l'influenza degli apparati radicali, ha permesso lo svolgimento contemporaneo di processi di ossidazione della sostanza organica, di ammonizzazione, di nitrificazione e denitrificazione.
- I vantaggi ecologici ed economici apportati da questo processo sono stati i seguenti.
 - Basso costo di costruzione e manutenzione con capacità di funzionamento all'interno di un ampio intervallo di condizioni climatiche.
 - Riduzione dei costi di gestione dei fanghi di circa il 30-40% rispetto a un impianto tradizionale.
 - Processo naturale con ridotto impiego energetico e quindi a bassissimo impatto ambientale.
 - Utilizzazione per piccoli insediamenti abitativi o produttivi.

- Ridotto impatto ambientale legato al contenimento degli odori molesti e alla diffusione di insetti.

Bibliografia

- Alef K. e Nannipieri P.** (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Albiach R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F.** (2000). *Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to horticultural soil*. *Bioresour. Technol.*, 75, pp 43–48.
- Armstrong W., Armstrong J.** (1988). *Phragmites australis. A preliminary study of soil-oxidizing sites and internal gas transport pathways*. *New Phytologist*, 108, pp 372-382.
- Armstrong W., Armstrong J. e Beckett P. M.** (1990). *Measurement and modelling of oxygen release from roots of Phragmites australis*, in Cooper P. F. e Findlater B. C. (editori), *Use of Constructed Wetlands in Water Pollution Control*. Pergamon press, Oxford, UK pp 41-53.
- Baath E.,** (1989). *Effects of heavy metals in soil on microbial process and population: a review*. In *Water Air Soil Pollut.* 47, pp 335–379.
- Bonmati M, Pujola M, Sana J, Soliva M, Felipe MT, Garau M, Ceccanti B, Nannipieri P** (1985) *Chemical properties, population of nitrite oxidizers, urease and phosphatase activities in sewage sludge-amended soils*, in *Plant Soil*, 84, 79–91.
- Bonmati M., Ceccanti, B.; Nannipieri, P.** (1998), *Protease extraction from soil by sodium pyrophosphate and chemical characterization of the extracts*, in *Soil Biology & Biochemistry*, 14, pp. 2113-2125
- Borin M. e Marchetti C.** (1997). *Sistemi di depurazione basati sull'uso di vegetazione macrofita. I. Caratteristiche e funzionamenti*, Centro Studi l'Uomo e l'Ambiente (editore), Ambiente, Risorse, Salute, 55, pp 7-13.

- Brix H., Sorrell B. K., Orr P. T.** (1992). *Internal pressurization and convective gas flow in some emergent freshwater macro-phytes*, *Mimnol. Oceanogr.* 37, pp 1420-1433.
- Brookes P.C.** (1995) *The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals*, in *Biol. Fertil. Soil*, 19, 269–279.
- Burns R.G.** (1982). *Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology*. *Soil Biol. Biochem.* 14:423-427.
- Ceccanti B., Nannipieri P., Cervelli S. and Sequi P.** (1978). *Fractionation of humus-urease complexes*. *Soil Biol. Biochem.* 10:39-45.
- Ceccanti B., Bonmati M. e Nannipieri P.** (1989). *Microdetermination of protease activity in humic bands of different sizes after analytical isoelectric focusing*. *Biol. Fertil. Soils* 7, pp. 202-206.
- Ceccanti B., García C., Nogales R., Benitez E. e Masciandaro G.** (1996). *Attività e ruolo delle sostanze umiche nell'ambiente: aspetti chimico-strutturali e biochimici*. Atti del convegno IHSS, 12-13 dicembre 1996, Udine.
- Cooper P. F.** (1990). *European design and operations guidelines for reed bed treatment systems*, prepared by the European Community/European Water Pollution Control Association Expert Contact Group on Emergent Hydrophyte Treatment Systems. December 1990.
- Cooper P. F., Green M. B.** (1995) *Reed bed treatment systems for sewage treatment in the United Kingdom - The first 10 years experience*, *Water Science and Technology*, 32, pp 317-327.

Cooper P. F., Job G. D., Green M. B., Shutes R. B. E. (1996) *Reed Beds and Constructed Wetlands for wastewater treatment*, WRc Swindon.

De Maeseneer J. (1990). *Experience concerning the use of constructed wetlands for drying of wastewater sludge*. Specialist group on the Use of Macrophytes in Water Pollution Control, Newsletter 3, pp 33-35.

Elvira C., Goicoechea M., Sampedro L., Mato S., Nogales R. (1996) *Bioconversion of solid paper-pulp mill sludge by earthworms*, in Bioresource Tecnology, pp173-177.

Epstein E., Taylor J. M., Chaney R. L., (1976). *Effects of Sewage Sludge and Sludge Compost Applied to Soil on Some Soil Physical and Chemical Properties* in Journal of Environmental Quality, 5, pp 422-26.

Fernandes S.A.P., Bettiol, W., Clementi, C. (2004). *Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity* , in Applied Soil Ecology, 30, pp 65–77.

Green M. B., Upton J. (1994) *Constructed reed beds: a cost-effective way to polish wastewater effluents for small communities*, Water Environment Research, 66, pp 188-192.

Hardey M., Ozimek T. (2001) *The effect of sewage sludge flooding on growth and morphometric parameters of Phragmites australis (Cav.) Trin. Ex Strudel*, in Ecological Engineering, 18, pp 343-350.

Hill D. T., Payne V. W. E., Rogers J. W. & Kown S. R. (1997). *Ammonia effects on the biomass production of five constructed wetland plant species*, in Bioresource and tecnology, 62, pp 109-113.

- Hinesly T. D., Jones R. L., Ziegler E. L.,** (1972). *Effects on Corn Applications of Heated Anaerobically Digested Sludge*, in *Compost Science*, 13, pp 26-30.
- Kelley W. D., Martens D. C., Reneau R. B, Simpson.T. W.** (1984) *Agricultural Use of Sewage Sludge:A Literature Review*, Virginia Water Resources Research Center Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Virginia 24060-3397.
- Kim B.J., Smith E.D.** (1997), *Evaluation of sludge dewatering reed bed: a niche for small systems*, *Water Science and Technology*, vol. 35, 6, 21-28.
- King L. D.,** (1976), *Fate of Nitrogen from Municipal Sludges*, in *Disposal of Residue on Land. Symposium Proceedings*, September 13-15, 1976, St. Louis, Missouri.
- Ladd J.N.** (1978). *Origin and range of enzymes in soil*. In; Burns R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp. 51-96.
- Ladd J.N.** (1984). *Some recent advances in soil biology and biochemistry*. In: *Proc. Nat. Soil Conf.*: 83-103. Australian Society of Soil Science, Brisbane.
- LaHann R. W.,** (1976). *Molybdenum Hazard in Land Disposal of Sewage Sludge*, in *Water, Air, and Soil Pollutmn*, 6, pp 3-8.
- Lal R.** (1994). *Sustainable land use system and soil resilience*, in *soil resilience and sustainable land use*. CAB International Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK.
- Liénard A., Esser D., Deguin A., Virloget F.** (1990), *Sludge dewatering and drying in reed beds: an interesting solution? General investigation and first trails in France*, Cambridge congress on : “The use of constructed wetlands in water pollution control”.

- Liénard A., Duchène P., Gorini D.** (1995), *A study of activated sludge dewatering in experimental reed-planted or unplanted sludge drying beds*, in Water Science and Technology, 32, 6, pp 251-262.
- Lutz J. F.,** (1965). *Glossary of Soil Science Terms*, in Soil Science Society of America, 29, pp 330-51.
- Masciandaro G., Ceccanti B. and Garcia C.** (1994). *Anaerobic digestion of straw and pig waste water: II. Optimization of the process*. Agrochimica 3:195-203
- Masciandaro G., Ceccanti B. and Gallardo-Lancho J.F.** (1998). *Organic matter properties in cultivated versus set-aside arable soils*. Agriculture, Ecosystems and Environment. 67: 267-274.
- Masciandaro G., Ceccanti B.** (1999). *Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substances*. Soil & Tillage Research. 51: 129-137.
- Masciandaro G., Ceccanti B., Ronchi V. and Bauer C.** (2000). *Kinetic parameters of dehydrogenase in the assessment of the response of soil to treatments by vermicompost and inorganic fertilisers*. Biol. Fertil. Soils. 32: 479-483.
- Nannipieri P., Ceccanti B., Conti C. e Bianchi D.** (1982). *Hidrolases extracted from soil: their properties and activities*. Soil Biol. Biochem. 14, pp.257-263.
- Nannipieri P. Grego S. And Ceccanti B.** (1990). *Ecological signifiante of the biological activity in soil*. In: J.M. Bollag and G. Stotzky (eds). Soil biochemistry, vol 6, pp 293-355.

- Nannipieri P., Sequi P. and Fusi P.** (1996). *Humus and enzyme activity*. in Humus substances in terrestrial ecosystems.
- Nielsen S. M.** (1990), *Sludge dewatering and mineralization in reed bed system*, In: Advances in water pollution control (IAWPRC),
- Nielsen S. M.** (1993), *Biological sludge drying in constructed wetlands*, in: Constructed wetlands for water quality improvement, pp 549-558.
- Ockiers P** (1999), Workshop on problems around sludge: the point of view of The European Union on national associations of water suppliers and waste waterservices (EUREAU)
- Pontes W.L.**, (2002). Mineralização de um biossólido industrial no solo e efeito desse na biomassa e atividade microbiana. M.Sc. Dissertation. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil, 73
- Potenz D., Righetti , Bellettieri A., Girardi F., Antonacci P., Calianno L.A. e Pergolese G.** (1985a). *Evoluzione della fitotossicità in un terreno trattato con acque reflue di frantoi oleari. Nota 1. Taratura del test “Germinazione del *Lepidium sativum*”* .in Inquinamento, 4, pp 49-54.
- Potenz D., Righetti, Bellettieri A., Girardi F., Antonacci P., Calianno L.A., Pergolese G.** (1985b). *Evoluzione della fitotossicità in un terreno trattato con acque reflue di frantoi oleari. Nota 2. Applicazione del test “Germinazione del *Lepidium sativum*” e studio comparativo di alcuni parametri chimici e chimico-fisici*. in Inquinamento 5, pp 49-55.
- Reddy G.B., Faza A.** (1989) *Dehydrogenase activity in sludge amended soil*. *Soil Biol Biochem* 21, pp 327–331

- Sabey B. R., Agbim N. N., Markstrom D. C.,** (1977). *Land Application of Sewage Sludge: IV. Wheat Growth, N Content, N Fertilizer Value, and N Use Efficiency as Influenced by Sewage and Wood Waste Mixtures.* in *Journal of Environmental Quality*, 6, pp 52-58.
- Sastre I., Vincent M. A., Lobo M. C.** (1996) *Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity*, in *Bioresource Technology*, pp 19-23.
- Saviozzi A., Bufalino P., Levi-Minzi R., Riffaldi R.** (2002) *Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study*, in *Biol Fertil Soils*, 35, 96–101.
- Saviozzi A., Biasci A., Riffaldi R., Levi-Minzi R.** (1998) *Long-term effects of farmyard manure and sewage sludge on some soil biochemical characteristics*, in *Biol Fertil Soils*, 30, in 100–106.
- Schierup H. H., Brix, H.,** (1990) *Danish experience with emergent hydrophyte treatment systems (EHTS) and prospects in the light of future requirements on outlet water quality*, in *Water Science technology*, 22, 65-72.
- Silviera D. J., L. E. Sommers.** (1977). *Extractability of Copper, Zinc, Cadmium, and Lead in Soils Incubated with Sewage Sludge* in *Journal of Environmental Quality* 6:47-52.
- Skujins J.** (1978) *History of abiotic soil enzyme research.* in Burns RG (ed) *Soil enzymes*. Academic Press, London, pp 1–49
- Sommers L. E.** (1977). *Chemical Composition of Sewage Sludges and Analysis of Their Potential Use as Fertilizers.* *Journal of Environmental Quality*, 6, 225-32.

Sommers L. E., Nelson D. W., (1978). *Analysis and Their Interpretation for Sludge Application to Agricultural Land.* in Application of Sludges and Wastewater on Agricultural Land. a Planning and Educational Guide, pp. 3.1 - 3.7. EPA Report No. MDC-35. U. S. Environmental Protection Agency, Washington.

Sommers L. E., Nelson D. W., Silviera D. J, (1979). *Transformations of Carbon, Nitrogen, and Metals in Soils Treated with Waste Materials.* in Journal of Environmental Quality 8 pp 287-94.

Stevenson F.J. (1982) *Humus Chemistry*, John Wiley & Sons (ed), Chichester.

Stewart N. E., Beauchamp E. G., Corke C. T., Webber L. R. (1975a). *Nitrate Nitrogen Distribution in Corn Land Following Applications of Digested Sewage Sludge.* Canadian Journal of Soil Science in 55, pp 287-94.

Tabatabai M.A. (1994). *Enzymes.* in Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties, No. 5. Soil Science Society pp. 775-833.

Tabatabai M.A. (1995). *Soil Enzymes* in Methods of soil analysis.

Vyzamal J. (1996) *Constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech republic : the first 5 years experience* , in Water science technology, 34, pp 159-164.